

Université de Montréal

**Affinité et perturbation membranaire de la BSP1, une protéine du liquide  
séminal bovin: une étude avec des membranes lipidiques modèles**

Par

Oussama Bourouah

Département de chimie

Faculté des arts et des sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures et postdoctorales  
en vue de l'obtention du grade de Maître ès (M. Sc.) en chimie

Novembre 2019

© Oussama Bourouah, 2019

Université de Montréal

Département de chimie  
Faculté des arts et des sciences

Ce mémoire intitulé:

**Affinité et perturbation membranaire de la BSP1, une protéine du liquide  
séminal bovin: une étude avec des membranes lipidiques modèles**

Présenté Par  
Oussama Bourouah

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

**Antonella Badia**

Président-rapporteur

**Michel Lafleur**

Directeur de recherche

**Suzanne Giasson**

Membre du jury

## Résumé

La BSP1, principale protéine du plasma séminal bovin, interagit avec les membranes des spermatozoïdes et joue un rôle crucial dans les événements qui conduisent à la fécondité des spermatozoïdes, lors du phénomène de la capacitation. Le but de cette recherche est d'investiguer la nature de ces interactions. Ce travail vise à démontrer l'influence des lipides qui composent les membranes sur l'action de la protéine BSP1. À l'aide de la fluorescence intrinsèque de la protéine, l'affinité de la protéine a été caractérisée pour quatre systèmes lipidiques. Les résultats montrent que la composition lipidique affecte significativement l'affinité de la protéine pour les membranes. Nous avons observé l'ordre suivant : 1-palmitoyl-2-oléoyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine (POPC) > POPC/1-palmitoyl-2-oléoyl-*sn*-glycéro-3-phosphoéthanolamine (POPE)  $\approx$  POPC/1-palmitoyl-2-oléoyl-*sn*-glycéro-3-phospho-L-sérine (POPS) > POPC/cholestérol. La protéine interagit préférentiellement avec POPC. La présence de POPE, POPS, ou cholestérol dans la membrane diminue systématiquement l'affinité. Il est connu que la présence de POPE ou cholestérol augmente l'empilement des lipides dans les membranes. Cet effet de condensation des chaînes pourrait être défavorable à l'insertion de la partie hydrophobe de la protéine dans les membranes et réduire ainsi l'affinité. La diminution de l'affinité de la protéine induite par la présence de POPS, un lipide chargé négativement, pourrait être associée aux interactions électrostatiques répulsives car la protéine porte une charge globale négative.

La littérature mentionne que la BSP1 extrait sélectivement les phospholipides de type choline et le cholestérol lors de son association avec les membranes de spermatozoïdes. Un efflux lipidique est aussi observé avec des membranes modèles. Nous avons désiré caractériser

la « solubilisation » des membranes par la BSP1, par diffusion dynamique de la lumière. Comme étape préliminaire, nous avons étudié comment le détergent Triton X-100 solubilise les membranes en utilisant cette technique. Les mesures démontrent que la composition lipidique des membranes (POPC, POPC/POPE, POPC/1-palmitoyl-2-oléoyl-*sn*-glycéro-3- [phospho-rac-(1-glycérol)] (POPG)) n'affecte pas le mécanisme général de solubilisation/reconstitution des membranes modèles. Il a été montré qu'il existe trois régions lors des processus de solubilisation pour les différents systèmes lipidiques : i) le détergent se distribue dans les membranes, ii) une coexistence de membranes saturées en détergents et de micelles mixtes de phospholipides/Triton X-100 et iii) exclusivement des micelles mixtes de phospholipides/Triton X-100. Nos résultats montrent que la forme conique de POPE augmente la résistance des membranes à la solubilisation. La présence de POPG, apportant une charge négative à l'interface des membranes, n'induit aucun changement aux processus de solubilisation/reconstitution des membranes par Triton X-100. La diffusion dynamique de la lumière a également permis d'observer si la protéine BSP1 induit des modifications morphologiques des membranes suite à son interaction avec les membranes de POPC. Nos observations n'ont montré aucune variation significative de la taille des particules lors du titrage des vésicules de POPC par la protéine, sur une gamme de rapport molaire de POPC/BSP1 variant de 20 à 0.6. Avec des compositions aussi différentes, on suppose une transition des vésicules saturées en protéine à des complexes de protéine avec un peu de lipides. Cependant, il semble impossible avec la diffusion dynamique de la lumière de différencier ces particules.

**Mots-clés :** Protéine BSP1, membranes modèles, phospholipides, fluorescence intrinsèque de la protéine, affinité, solubilisation/reconstitution, diffusion dynamique de la lumière, Triton X-100.

## Abstract

BSP1, the main protein in bovine seminal plasma, interacts with sperm membranes and plays a crucial role in events that lead to sperm fertility, during the capacitation. The purpose of this research is to investigate the nature of these interactions. This work aims to demonstrate the influence of the lipids that compose membranes on the action of the BSP1 protein. Using the intrinsic fluorescence of the protein, the affinity of the protein was characterized for four lipid systems. The results show that the lipid composition significantly affects the affinity of the protein for membranes. We observed the following order: 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC) > POPC/1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (POPE)  $\approx$  POPC/1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoserine (POPS) > POPC/cholesterol. The protein interacts preferentially with POPC. The presence of POPE, POPS, or cholesterol in membranes decreases systematically the affinity. It is established that the presence of POPE or cholesterol increases the packing of lipids in membranes. This condensation effect could be detrimental to the insertion of the hydrophobic part of the protein into the membranes and reduces, as a consequence, the affinity. The decrease in protein affinity induced by the presence of POPS, a negatively charged lipid, could be associated with repulsive electrostatic interactions as the protein global charge is negative.

The literature mentions that BSP1 selectively extracts choline phospholipids and cholesterol when combined with sperm membranes. A lipid efflux is also observed with model membranes. We characterized membrane "solubilisation" by BSP1, using dynamic light scattering. As a preliminary step, we studied how Triton X-100 detergent solubilizes membranes using this technique. The measurements showed that the lipid composition of the membranes

does not affect the general solubilization/reconstitution mechanism of the model membranes (POPC, POPC/POPE, POPC/1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-(1-*rac*-glycerol) (POPG)). It is known that three different regions exist during the solubilization process for the different lipid systems: i) the detergent is distributed in the membranes, ii) a coexistence of membranes saturated with detergents and mixed phospholipid/Triton X-100 micelles and iii) exclusively mixed phospholipid/Triton X-100 micelles. Our results show that the conical shape of POPE increases the resistance of the membranes to solubilization. The presence of POPG, bringing a negative charge at the membrane interface, does not induce any change in solubilization/reconstitution processes. Dynamic light scattering also made it possible to observe if the BSP1 protein induces morphological changes in the membranes following its interaction with POPC membranes. Our observations showed no significant variation in particle size during the titration of POPC vesicles by the protein, over a molar ratio range of POPC/BSP1 from 20 to 0.6. Considering such different compositions, a transition from vesicles saturated with protein to protein complexes with some lipids is assumed. However, it appeared impossible with dynamic light scattering to differentiate these particles.

**Keywords:** BSP1 protein, model membranes, phospholipids, protein intrinsic fluorescence, affinity, solubilization/reconstitution, dynamic light scattering, Triton X-100.

# Table des matières

<b>Résumé.....</b>	<b>I</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>III</b>
<b>Table des matières.....</b>	<b>V</b>
<b>Liste des tableaux.....</b>	<b>VIII</b>
<b>Liste des figures.....</b>	<b>X</b>
<b>Liste des symboles et abréviations.....</b>	<b>XII</b>
<b>Remerciements .....</b>	<b>XI</b>
<b>Chapitre 1 : Introduction .....</b>	<b>1</b>
1.1 Le plasma séminal .....	2
1.2 Protéine BSP1.....	3
1.3 Membrane des spermatozoïdes .....	7
1.4. Formation des membranes modèles .....	10
1.5 Interaction de la BSP1 avec les membranes des spermatozoïdes .....	14
1.6 Interaction de la BSP1 et les lipides.....	17
1.7 Triton X-100.....	20
1.8 Interaction lipides/TX-100 .....	21
1.9 Fluorescence intrinsèque de la BSP1 .....	24
1.10 Diffusion dynamique de la lumière .....	27
<b>Chapitre 2 : Étude fluorométrique des interactions entre la BSP1 et les membranes modèles.....</b>	<b>30</b>
2.1 Introduction .....	30
2.2 Matériel et méthodes .....	30
2.2.1 Matériel.....	30
2.2.2 Préparation des LUV.....	31

2.2.3 Préparation et quantification de la protéine .....	32
2.2.4 Titrage fluorométrique .....	32
2.2.5 Analyses statistiques .....	32
2.3 Résultats .....	33
2.4 Discussion .....	42
<b>Chapitre 3 : Étude par diffusion dynamique de la lumière de la solubilisation membranaire et reconstitution par Triton X-100 .....</b>	<b>48</b>
3.1 Introduction .....	48
3.2 Matériel et méthodes .....	48
3.2.1 Matériel .....	48
3.2.2 Préparation des solutions .....	48
3.3.3 Titrage par DLS et évaluation des données .....	49
3.3 Résultats .....	50
3.3.1 Interaction entre les LUV de POPC et TX-100 .....	50
3.3.1.1 Titrage des LUV de POPC par TX-100 (solubilisation) .....	50
3.3.1.2 Titrage du TX-100 par des LUV de POPC (reconstitution).....	51
3.3.2 Interaction entre les LUV de POPC/POPE et TX-100 .....	54
3.3.2.1 Titrage des LUV de POPC/POPE par TX-100 (solubilisation) .....	54
3.3.2.2 Titrage du TX-100 par des LUV de POPC/POPE (reconstitution).....	55
3.3.3 Interaction entre les LUV de POPC/POPG et TX-100.....	57
3.3.3.1 Titrage des LUV de POPC/POPG par TX-100 (solubilisation).....	57
3.3.3.2 Titrage du TX-100 par des LUV de POPC/POPG (reconstitution) .....	59
3.3.4 Effet de la composition lipidique sur le titrage de solubilisation/reconstitution .....	61
3.4 Discussion .....	63
<b>Chapitre 4 : Étude des changements morphologiques des vésicules de POPC induits par la BSP1 par la diffusion dynamique de la lumière.....</b>	<b>70</b>
4.1 Introduction .....	70



4.2 Matériel et méthodes .....	70
4.2.1 Matériel .....	70
4.2.2 Préparation des solutions .....	70
4.2.3 Mesure de la DLS .....	71
4.3 Résultats .....	71
4.3.1 Effet de la BSP1 sur la taille des vésicules de POPC étudié par la DLS .....	71
4.4 Discussion .....	75
<b>Chapitre 5 : Conclusion générale .....</b>	<b>77</b>
<b>Références .....</b>	<b>79</b>

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1.1 :</b> Composition lipidique de la membrane plasmique des spermatozoïdes de bovins .....	9
<b>Tableau 1.2 :</b> Description détaillée des chaînes acyles en position <i>sn</i> -1/2 des phosphatidylcholines qui constituent les membranes de spermatozoïdes bovins.....	10
<b>Tableau 1.3 :</b> Propriétés de fluorescence des acides aminés aromatiques dans l'eau à pH neutre. Les longueurs d'onde maximales d'absorption et d'émission sont indiquées comme $\lambda_{\max}$ , le coefficient d'absorption molaire est indiqué comme $\epsilon_{\max}$ et $\Phi_{\max}$ indique le rendement quantique de fluorescence.....	25
<b>Tableau 3.1 :</b> Variation de distribution de taille pour le titrage des LUV de POPC par le TX-100.....	51
<b>Tableau 3.2 :</b> Variation de distribution de taille pour le titrage du TX-100 par des LUV de POPC.....	52
<b>Tableau 3.3 :</b> Variation de distribution de taille pour le titrage des LUV de POPC/POPE 60/40 (mol/mol) par le TX-100.....	54
<b>Tableau 3.4 :</b> Variation de distribution de taille pour le titrage du TX-100 par des LUV de POPC/POPE 60/40 (mol/mol) .....	56
<b>Tableau 3.5 :</b> Variation de distribution de taille pour le titrage des LUV de POPC/POPG 60/40 (mol/mol) par le TX-100.....	58
<b>Tableau 3.6 :</b> Variation de distribution de taille pour le titrage du TX-100 par des LUV de POPC/POPG 60/40 (mol/mol).....	60
<b>Tableau 3.7 :</b> Rapports molaires $R_{\text{sat}}^{\text{bicouche}}$ et $R_{\text{sat}}^{\text{micelle}}$ obtenus pour les différents systèmes lipidiques.....	63
<b>Tableau 4.1 :</b> Variation de distribution de taille des vésicules POPC en présence de concentrations croissantes de la protéine BSP1, à $25.0 \pm 0.1$ °C.....	72

<b>Tableau 4.2 :</b> Variation de distribution de taille d'un échantillon formé de 47 $\mu\text{M}$ de POPC et 123 $\mu\text{M}$ de BSP1 (correspondant à l' <b>Échantillon 14</b> du titrage présenté au <b>Tableau 4.1</b> ) en fonction du temps à $25.0 \pm 0.1$ °C .....	73
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

## Liste des figures

<b>Figure 1.1</b> : Glandes sexuelles accessoires du taureau .....	3
<b>Figure 1.2</b> : Structure primaire de protéines BSP .....	6
<b>Figure 1.3</b> : Structure schématique du spermatozoïde de mammifère.....	7
<b>Figure 1.4</b> : Structure moléculaire des lipides utilisés pour la formation des membranes modèles .....	11
<b>Figure 1.5</b> : Représentation schématique de l'effet de la géométrie de lipides sur la courbure des membranes.....	13
<b>Figure 1.6</b> : Représentation schématique des différents types de vésicules .....	14
<b>Figure 1.7</b> : Mécanisme de la capacitation des spermatozoïdes bovins par les protéines BSP1 .....	16
<b>Figure 1.8</b> : Structure moléculaires générale du Triton-X100 (n est le nombre d'oxyde d'éthylène polymérisé). .....	21
<b>Figure 1.9</b> : Les trois domaines de la solubilisation des vésicules par le détergent.....	23
<b>Figure 1.10</b> : <b>A)</b> Représentation schématique du montage de l'appareillage de diffusion dynamique de la lumière. <b>B)</b> Fluctuation de l'intensité de la lumière diffusée avec le temps. <b>C)</b> Évolution de la fonction d'autocorrélation.....	29
<b>Figure 2.1</b> : Spectres d'émission de fluorescence de la BSP1 (initialement 1.01 $\mu$ M) en fonction de différentes concentrations de POPC.....	34
<b>Figure 2.2</b> : Courbes de titrage obtenues par fluorescence intrinsèque de la protéine BSP1 avec des LUV de diverses compositions lipidiques .....	36
<b>Figure 2.3</b> : Influence de la composition lipidique sur la grandeur du déplacement hypsochromique lors de la liaison de la BSP1 aux LUV .....	38
<b>Figure 2.4</b> : Influence de la composition lipidique sur le paramètre $F_{\infty}/F_0$ pour des vésicules de POPC contenant différente fraction molaire de : <b>A)</b> cholestérol, <b>B)</b> POPE, <b>C)</b> POPS.....	39

<b>Figure 2.5</b> : Variation de la constante d'affinité en fonction de la fraction molaire en POPC dans les vésicules contenant : <b>A)</b> cholestérol, <b>B)</b> POPE, <b>C)</b> POPS.....	41
<b>Figure 3.1</b> : Changement de la morphologie des particules pendant le titrage des LUV de POPC par le TX-100 (cercle), et pour le titrage du TX-100 par des LUV de POPC (triangle) .....	53
<b>Figure 3.2</b> : Changement de la morphologie des particules pendant le titrage des LUV de POPC/POPE 60/40 (mol/mol) par le TX-100 (cercle), et pour le titrage du TX-100 par des LUV de POPC/POPE 60/40 (mol/mol) (triangle).....	57
<b>Figure 3.3</b> : Changement de la morphologie des particules pendant le titrage des LUV de POPC/POPG 60/40 (mol/mol) par le TX-100 (cercle), et pour le titrage du TX-100 par des LUV de POPC/POPG 60/40 (mol/mol) (triangle) .....	61
<b>Figure 3.4</b> : Changement de la zone de coexistence pendant la solubilisation membranaire et reconstitution par Triton X-100 .....	62
<b>Figure 3.5</b> : Hypothèse de l'additivité du paramètre d'ordre pour le mélange de POPC/POPE - TX-100.....	68
<b>Figure 4.1</b> : Variation thermique de la taille des particules formées dans un échantillon avec un <b>A)</b> ratio POPC/BSP1 = 15, et <b>B)</b> ratio POPC/BSP1 = 5.....	74

## Liste des symboles et abréviations

% (mol/mol) : Pourcentage molaire

%(w/w) : Pourcentage massique

[BSP1]<sub>Libre</sub> : concentration molaire de la protéine BSP1 libre en solution

[BSP1]<sub>Liée</sub> : Concentration molaire de la protéine BSP1 liée aux vésicules lipidiques

[BSP1]<sub>Totale</sub> : Concentration molaire totale de la protéine BSP1

[L] : Concentration lipidique

[W] : Concentration molaire de l'eau

$\langle d(H) \rangle^2$  : Carré de la moyenne arithmétique de diamètres des particules

$\langle d(H)^2 \rangle$  : Valeur moyenne des carrées de diamètres des particules

® : Marque déposée

°C : degré Celsius

$a_0$  : Aire de la tête hydrophile d'un amphiphile à l'interface

bbPC : Phosphatidylcholine extraite de cerveaux bovins (*Bovine Brain PC*)

BSP : Liant aux spermatozoïdes (*Binder of SPerm* en anglais)

CAC : Concentration critique d'agrégation (*Critical Aggregation Concentration* en anglais)

Chol : Cholestérol

CMC : Concentration micellaire critique (*Critical Micelle Concentration* en anglais)

Cys : Cystéine

D : Coefficient de diffusion translationnelle

d(H) : Diamètre hydrodynamique

Diacyl-PC : Diacyl- phosphatidylcholine

DLS : Diffusion dynamique de la lumière (*Dynamic Light Scattering* en anglais)

DMPC : 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine

DMPG : 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycéro-3-[phospho-rac-(1 -glycérol)]

DOPC : 1,2-dioleoyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine

DPPE : 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycéro-3-phosphoéthanolamine

F : Intensité de fluorescence

F<sub>0</sub> : Intensité de fluorescence en absence de lipides

F<sub>∞</sub> : Intensité de la fluorescence lorsque toute la BSP est liée aux lipides

F<sub>n</sub> : Fibronectine

f<sub>p</sub> : Fraction de la protéine BSP1 liée aux vésicules lipidiques

g : Gramme

HDL : Lipoprotéines de haute densité (*High Density Lipoprotein* en anglais)

H<sub>II</sub> : Phase hexagonale inversée

l<sub>0</sub> : Longueur des chaînes acyles d'un amphiphile

ITC : Titrage calorimétrique isotherme (*Isothermal Titration Calorimetry* en anglais)

k : Constante de Boltzmann

kDa : KiloDalton

$K_x$  : Constante d'affinité

LUV : Vésicules larges unilamellaires (*Large Unilamellar Vesicles* en anglais)

Lyso-PC : Lysophosphatidylcholine

m : Mètre

M : Concentration molaire (moles/litre)

min : Minute

MLV : Vésicules multilamellaires (*Multilamellar Vesicles* en anglais)

mol : Mole

nm : Nanomètre

o-PC : Ortho-phosphorylcholine

$P$  : Paramètre d'empilement

PC : Phosphocholine

PE : Phosphoéthanolamine

PG : Phosphoglycérol

pH : Potentiel hydrogène

Phe : Phénylalanine

pI : Point isoélectrique

PMMA : Polyméthacrylate de méthyle



POPC : 1-palmitoyl-2-oléoyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine

POPE : 1-palmitoyl-2-oléoyl-*sn*-glycéro-3-phosphoéthanolamine

POPG : 1-palmitoyl-2-oléoyl-*sn*-glycéro-3- [phospho-rac-(1-glycérol)]

POPS : 1-palmitoyl-2-oléoyl-*sn*-glycéro-3-phospho-L-sérine

PS : Phosphosérine

R : Rapport molaire détergents/lipides

RPE : Résonance paramagnétique électronique

$R_{\text{sat}}^{\text{bicouche}}$  : Rapport molaire détergents- $\text{CMC}_{\text{TX-100}}$ /lipides à la saturation des bicouches mixtes

$R_{\text{sat}}^{\text{micelle}}$  : Rapport molaire détergents- $\text{CMC}_{\text{TX-100}}$ /lipides à la saturation des micelles mixtes

SM : Sphingomyéline

SPR : Résonance plasmonique de surface (*Surface Plasmon Resonance* en anglais)

SUV : Vésicules petites unilamellaires (*Small Unilamellar Vesicles* en anglais)

T : Température

Tris : Tris(hydroxyméthyl) aminoéthane

Trp : Tryptophane

TX-100 : Triton X-100

Tyr : Tyrosine

UV : Ultraviolette

$v_0$  : Volume des chaînes hydrophobes d'un amphiphile

$\varepsilon_{\text{max}}$  : Coefficient d'absorption molaire

$\eta$  : Viscosité du milieu

$\lambda$  : Longueur d'onde

$\lambda_{\text{max}}$  : Longueur d'onde maximale

$\mu\text{m}$  : Micromètre

$\Phi_{\text{max}}$  : Rendement quantique de fluorescence

*À mes parents*

## Remerciements

Tout d'abord, je remercie mon directeur de recherche, Prof. Michel Lafleur, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire à l'Université de Montréal. Je le remercie aussi pour son encadrement, son énorme soutien scientifique, son support moral, son encouragement et sa disponibilité tout au long de ces travaux de recherche. Je le remercie également pour son investissement et ses précieux conseils lors de la rédaction de ce manuscrit.

J'adresse en particulier mes sincères remerciements à Prof. Suzanne Giasson et à Prof. Antonella Badia qui ont bien voulu être les rapporteuses de mon travail.

Je remercie également mes collègues du groupe de recherche avec lesquels j'ai passé de bons moments, Adrian, Mehdi, Cécile, Yasamin, Matteo. Un grand merci également aux employés que j'ai rencontrés au cours de mes années de maîtrise, qui ont été toujours chaleureusement prêts à tendre leurs mains quand j'avais besoin.

Merci également à tous mes chers enseignants du département de chimie pour m'avoir transmis leur passion pour la chimie.

Mes remerciements les plus chaleureux vont particulièrement à mes parents pour leurs encouragements et leur soutien à distance. Merci pour votre amour inconditionnel même dans les moments difficiles. Sans vos encouragements, l'atteinte de mon objectif n'aurait pas été possible. Je sais qu'ils sont toujours là pour moi. Je remercie également ma sœur, mon frère, et ma tante pour leur soutien, leur encouragement. Bien sûr, je n'oublie pas ma tante au Canada pour son soutien constant mais aussi d'être toujours là et de m'avoir supporté, sans oublier évidemment ses bons plats.

Pour finir, je tiens à remercier l'Université de Montréal de m'avoir octroyé un financement pour mes études.

Je vous souhaite à toutes et tous le meilleur.

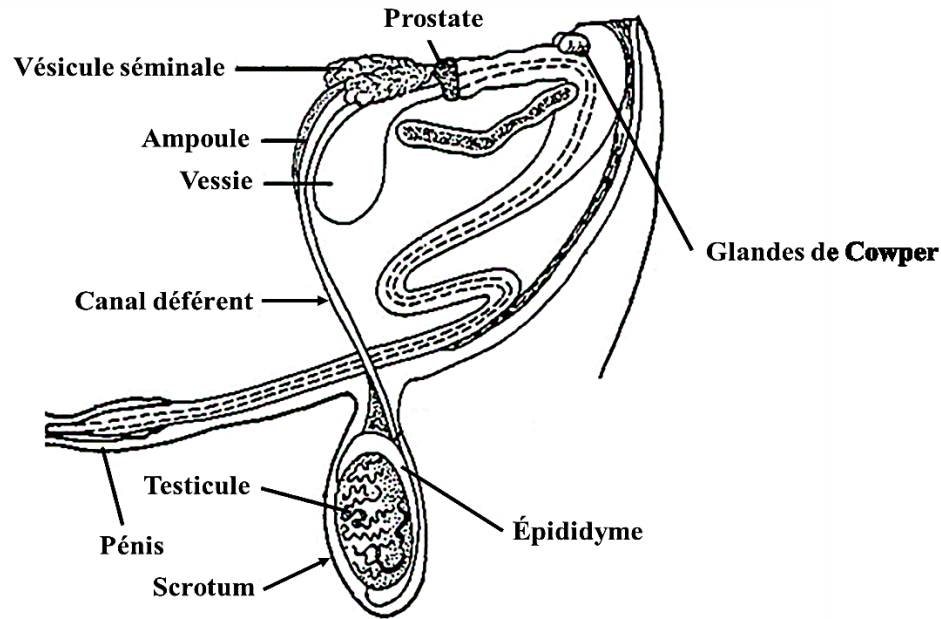
# Chapitre 1 : Introduction

Au cours des dernières décennies, plusieurs travaux ont été menés dans différents laboratoires sur l'étude de la structure et du fonctionnement de l'ensemble des protéines de la membrane spermatique et du plasma séminal (Manjunath et Sairam 1987, Henricks et al. 1998, Gatti et al. 2000, Nauc et Manjunath 2000, Manjunath et Thérien 2002). Le plasma séminal, le liquide dans lequel les spermatozoïdes sont en suspension lors de l'éjaculation, a un rôle physiologique très important en tant que porteur des spermatozoïdes le long du tractus génital féminin, leur donnant les conditions nécessaires pour atteindre l'ovocyte (Mann et Lutwak-Mann 1981). Certaines des protéines contenues dans le plasma séminal se lient aux spermatozoïdes en raison de leur affinité pour les lipides présents dans la membrane plasmique. Une famille de ces protéines appelée BSP (*Binder of SPerm proteins*) interagit avec la membrane plasmique des spermatozoïdes au moment de l'éjaculation, ce qui joue un rôle crucial dans la capacitation des spermatozoïdes. Il est donc important de comprendre l'interaction des protéines BSP avec les membranes des spermatozoïdes dans le but de comprendre les événements moléculaires impliqués dans le processus de capacitation. Nos recherches ont porté en premier lieu sur la quantification de l'affinité de la protéine BSP1, la principale protéine de cette famille, avec des membranes lipidiques modèles, en utilisant la spectroscopie de la fluorescence. Nous avons examiné comment l'affinité de la protéine est modulée par la composition lipidique. Il a été déjà montré dans la littérature que la protéine BSP1 extrait des lipides lors de son interaction avec des membranes modèles, conduisant par la suite à la « solubilisation » des membranes (Therrien et al. 2013). Pour cela, nous nous sommes intéressés à étudier l'impact de la protéine BSP1 sur la morphologie des membranes modèles à

l'aide de la technique de diffusion dynamique de la lumière. Comme étape préliminaire, nous avons investigué comment le détergent Triton X-100 solubilise les membranes en utilisant la diffusion dynamique de la lumière.

## **1.1 Le plasma séminal**

Le plasma séminal consiste en un mélange complexe de sécrétions provenant principalement de l'épididyme, des testicules et des glandes sexuelles accessoires (vésicules séminales, ampoules, prostate, glandes d'ampoule urétrales, **Figure 1.1**) (Manjunath et Thérien 2002, Töpfer-Petersen et al. 2005, Moura et al. 2010). Son volume et sa composition varient selon divers aspects, tels que les espèces, les individus et même les éjaculations (Villemure et al. 2003, Jobim et al. 2004, Cardozo et al. 2006). Dans ce contexte, il existe également une influence évolutive de l'anatomie de l'appareil reproducteur masculin et féminin qui détermine les caractéristiques séminales spécifiques à l'espèce (Jobim et al. 2004). Le plasma séminal contient une quantité variable de composants biochimiques, enzymes, phosphatases, nucléases et glucides (Jobim et al. 2004).



**Figure 1.1 :** Glandes sexuelles accessoires du taureau. Adaptée de la référence (Moura et al. 2006) avec la permission de *American Society Andrology*.

Le plasma séminal transporte les spermatozoïdes et fournit plusieurs facteurs essentiels à leur survie; ainsi il joue un rôle important dans les processus liés à la capacitation des spermatozoïdes. Il participe à combler les besoins énergétiques, à la stabilité de leur membrane, à la protection contre les changements de pression osmotique et contre l'oxydation et à leur motilité (Manjunath et Thérien 2002, Kareskoski et Katila 2008, Muiño-Blanco et al. 2008, Moura et al. 2010).

## 1.2 Protéine BSP1

Le plasma séminal bovin contient quatre principales protéines, appelées BSP-A1, BSP-A2, BSP-A3 et BSP-30kDa (**Figure 1.2**). Initialement, BSP signifiait *Bovine Seminal Plasma* pour plasma séminal bovin mais présentement, il signifie *Binder of SPerm*, indiquant les protéines se liant aux spermatozoïdes. La désignation de la lettre « A » exprime leur acidité (pI



compris entre 3.6 et 5.2 (Manjunath et Thérien 2002)). Les protéines BSP-A1/A2 et BSP-A3 ont des masses moléculaires de 15 et 16.5 kDa, tandis que les protéines de BSP-30kDa ont une masse moléculaire de 28 à 30 kDa (Manjunath et al. 1987). Tous les membres de cette famille, à l'exception de BSP-A3, sont glycosylés. Les protéines BSP-A1/A2, aussi appelées PDC-109 ou gonadostatine, présentent la même composition en acides aminés et ne diffèrent que par le degré de glycosylation, mais sont souvent considérées comme une entité chimique unique (Esch et al. 1983).

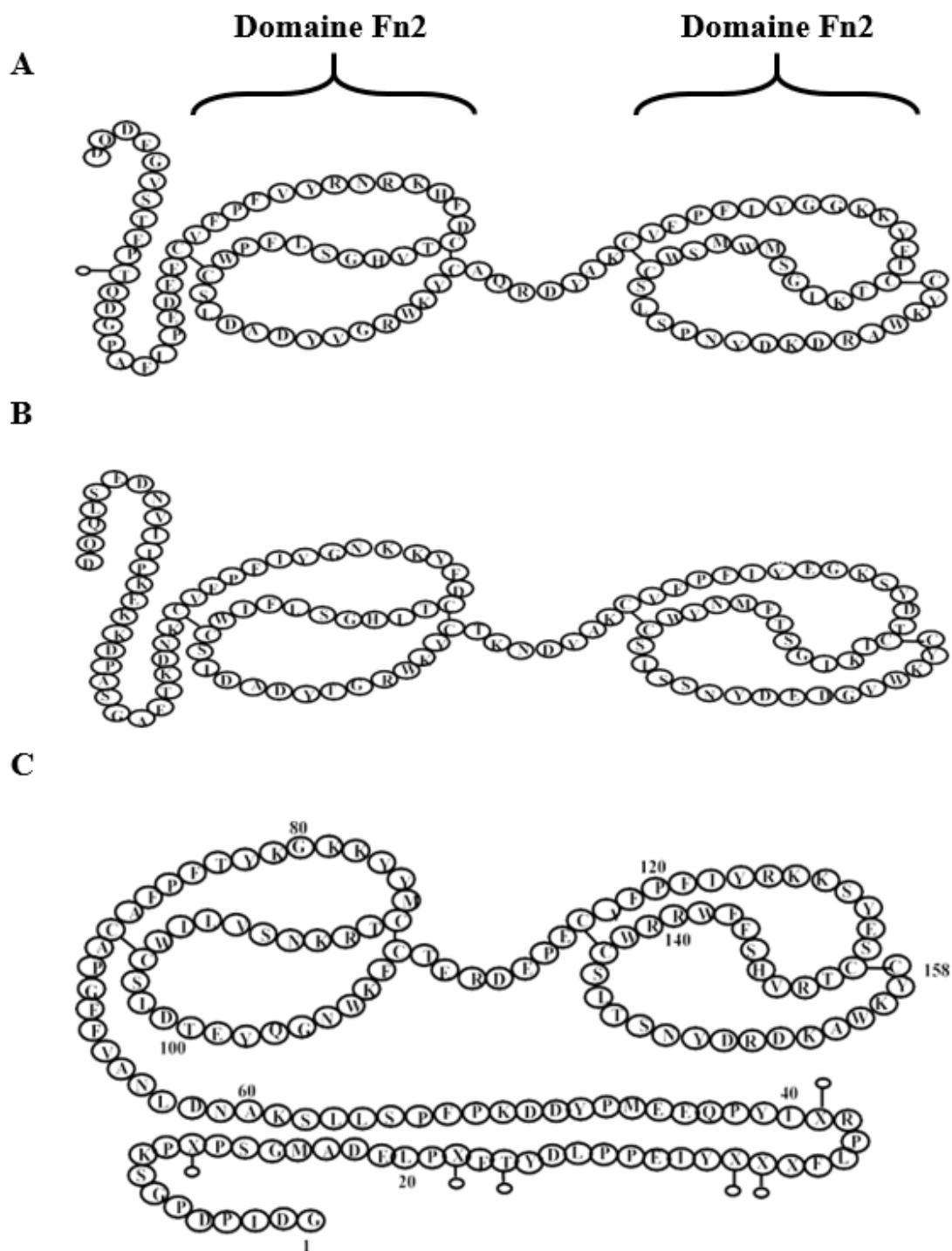
Comme de nombreux autres gènes de la superfamille BSP ont été découverts récemment, une nouvelle façon uniforme de nommer les protéines BSP a été proposée par Manjunath et collaborateurs (Manjunath et al. 2009). Selon cette nomenclature, les BSP-A1/A2, BSP-A3 et BSP-30-kDa sont remplacées par BSP1, BSP3 et BSP5.

Les BSP sont sécrétées par des glandes sexuelles, en particulier les vésicules séminales et les ampoules (Calvete et al. 1994, Salois et al. 1999), à une concentration élevée; elle varie de 31.4 à 46.7 mg/ml, ce qui représente entre 40 à 57% de l'ensemble des protéines plasmatiques du séminal bovine (Nauc et Manjunath 2000). Parmi les BSP1, BSP3, BSP5, la concentration de BSP1 est plus élevée et représente 38% du total, tandis que BSP3 et BSP5 représentent 3 à 4% de la fraction protéique totale (Nauc et Manjunath 2000).

Plusieurs études ont montré que les BSP se lient aux spermatozoïdes au moment de l'éjaculation. Les quantités relatives des protéines BSP1:BSP3:BSP5 trouvées à la surface du spermatozoïde représente des rapports de 4:1:1 (Nauc et Manjunath 2000). Les BSP interagissent avec les phospholipides contenant la tête choline, abondants dans les membranes des spermatozoïdes (Desnoyers et Manjunath 1992, Manjunath et al. 1994, Moreau et al. 1998).

Elles favorisent l'extraction des phospholipides (Thérien et al. 1999) et du cholestérol (Therien et al. 1998, Moreau et al. 1999, Moreau et Manjunath 1999). Ces changements entraînent une réduction considérable du rapport cholestérol/phospholipide dans les membranes des spermatozoïdes. Dans le mémoire, nous nous intéressons particulièrement à la protéine BSP1, puisqu'elle représente la majorité des protéines de la famille BSP, et qu'elle est impliquée dans le processus de capacitation des spermatozoïdes.

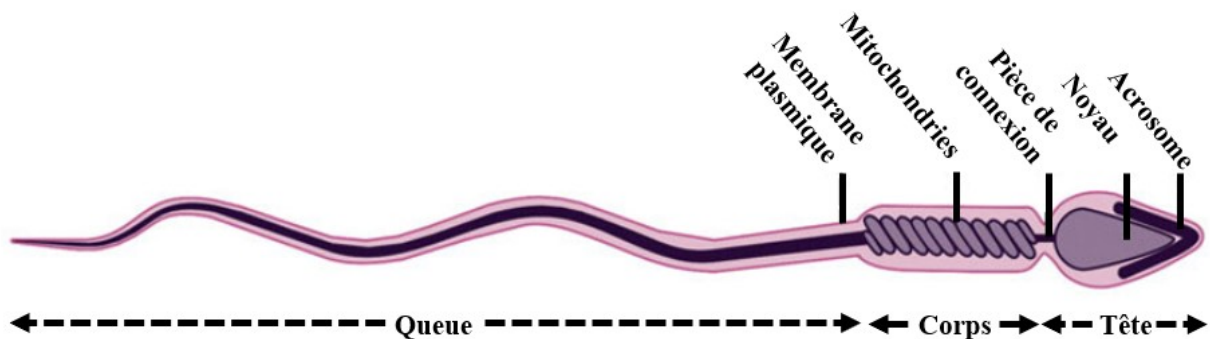
Les protéines BSP ont deux domaines de type II, similaires à ceux de la fibronectine (Esch et al. 1983, Calvete et al. 1996), qui leur donnent la capacité de se lier aux phospholipides (Moreau et al. 1998) et à l'héparine (Chandonnet et al. 1990). La BSP1 est composée d'un domaine N-terminal de 23 résidus, suivi de deux domaines de fibronectine de type II (Fn2A: Cys24 - Cys61; Fn2B: Cys69 - Cys109) et de deux ponts disulfures intramoléculaires (Esch et al. 1983, Banyai et al. 1990, Manjunath et al. 2007). Les deux domaines fibronectine sont séparés par un pont de sept résidus (résidus 61-68). Ces deux domaines sont composés par deux feuillets  $\beta$  antiparallèles séparés par deux tours (Constantine et al. 1992, Sticht et al. 1998). Des études de chromatographie d'exclusion faites à température ambiante, ont montré que les protéines BSP1 ont tendance à s'agréger de manière polydisperse (Gasset et al. 1997).



**Figure 1.2 :** Structure primaire de protéines BSP. Les sites de glycosylation sont indiqués par des cercles vides. **A)** BSP1. **B)** BSP3. **C)** BSP5. Adaptée de la référence (Manjunath et Thérien 2002) avec la permission de *Elsevier*.

### 1.3 Membrane des spermatozoïdes

Les spermatozoïdes sont formés de trois segments : la tête, le corps et la queue (ou le flagelle) (**Figure 1.3**). Ces trois parties ont chacune leurs fonctions particulières (Martínez et Morros 1996). La tête du spermatozoïde contient le noyau et l'acrosome. La fonction du flagelle est de favoriser la mobilité du spermatozoïde pour traverser le tractus génital féminin et de pénétrer dans la zone pellucide de l'ovocyte. Et finalement, le corps contient les mitochondries, qui génèrent l'énergie nécessaire à la motilité des spermatozoïdes, permettant un mouvement de glissement qui génère des ondes courbes dans la queue. Toutes ces caractéristiques structurelles spécialisées du spermatozoïde sont centrées sur son activité fonctionnelle unique, c'est-à-dire assurer la libération du matériel génétique contenu dans le noyau du spermatozoïde vers l'ovocyte, où se produit l'union des pronucléus masculin et féminin lors de la fécondation (Lambert et Battaglia 1993).



**Figure 1.3 :** Structure schématique du spermatozoïde de mammifère. Adaptée de la référence (Borg et al. 2009) avec la permission de *Oxford Academic*.

La membrane plasmique recouvre l'ensemble du spermatozoïde. Elle a une grande spécificité, agissant comme une barrière sélective entre les composants présents dans l'environnement intra et extracellulaire, et tout événement qui modifie sa structure peut

compromettre sa fonction (Squires et al. 1999). Par exemple, la détérioration de cette structure peut entraîner la perte de l'homéostasie et la mort de la cellule (Amann et Pickett 1987). Par conséquent, l'intégrité de la membrane plasmique joue un rôle clé dans la survie des spermatozoïdes dans le tractus génital féminin et dans le maintien de sa capacité reproductive (Parks et Graham 1992). Toutes les molécules lipidiques présentes dans les membranes des spermatozoïdes sont amphipathiques, c'est-à-dire qu'elles ont une extrémité hydrophile, en contact avec les milieux extérieurs, et une extrémité hydrophobe, dans le milieu intérieur de la membrane (Squires et al. 1999).

La composition lipidique de la membrane plasmique des spermatozoïdes bovins est présentée au **Tableau 1.1**. Les lipides membranaires les plus abondants sont les phospholipides, principalement la phosphatidylcholine, la phosphatidyléthanolamine, la phosphatidylsérine et la sphingomyéline, composés d'une tête polaire et de deux chaînes hydrocarbonées. Les différences de longueur et de saturation des chaînes acyles des phospholipides sont importantes parce qu'elles influencent la capacité des molécules de phospholipides à se grouper, affectant ainsi la fluidité de la membrane (Martínez et Morros 1996, Ricker et al. 2006). Le cholestérol s'insère entre les chaînes acyles des phospholipides et stabilise la membrane (Martínez et Morros 1996, Ohvo-Rekilä et al. 2002).

**Tableau 1.1 :** Composition lipidique de la membrane plasmique des spermatozoïdes de bovins. Adapté de la référence (Parks et al. 1987) avec la permission de *Oxford Academic*.

Type de composant	Proportion*
Phosphatidylcholines (PC)	52.8
Cholestérol	22
Phosphatidyléthanolamines (PE)	11.8
Sphingomyélines (SM)	8.9
Lysophosphatidylcholines (Lyso-PC)	1.2
Phosphatidylsérines (PS)	1

(\*) Les valeurs exprimées en pourcentage de lipide total (mol %)

Pour les expériences de ce mémoire, la 1-palmitoyl-2-oléoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine (POPC) a été utilisée comme lipide principal pour la formation des membranes modèles puisqu'elle a une tête polaire choline, soit celle qui est la plus abondante dans les membranes de spermatozoïdes bovins (**Tableau 1.2**). En général, les phospholipides sont constitués d'une chaîne saturée en position *sn*-1, tandis qu'une chaîne insaturée se retrouve en position *sn*-2. La POPC est un phospholipide zwitterionique avec une chaîne dérivée de l'acide palmitique (16:0) en *sn*-1 et une chaîne dérivée de l'acide oléique (18:1) en *sn*-2. La composition en chaînes acyles de ce lipide est différente de celle des phosphatidylcholines des membranes des spermatozoïdes. Au niveau de ces membranes, la chaîne saturée en position *sn*-1 est généralement une chaîne palmitique (16:0). Cependant, la chaîne insaturée en position *sn*-2 contient généralement 22 atomes de carbone et possède de 1 à 6 doubles liaisons *cis*, celle avec 6 doubles liaisons étant la plus abondante. Dans le mémoire, pour mieux comprendre l'effet de la protéine BSP1 sur les membranes lipidiques des spermatozoïdes, des membranes lipidiques modèles de différentes compositions ont été préparées. L'utilisation de la POPC ayant des chaînes de 16:0 et 18:1 permet donc de produire des membranes modèles fluides avec des groupements polaires similaires aux membranes natives mais ne reproduit pas l'effet que

pourrait avoir les chaînes polyinsaturées des membranes de spermatozoïdes. L'utilisation de la POPC présente l'avantage de ne pas avoir de souci au niveau de l'oxydation des chaînes polyinsaturées (Shaikh et al. 2002) et est moins chère.

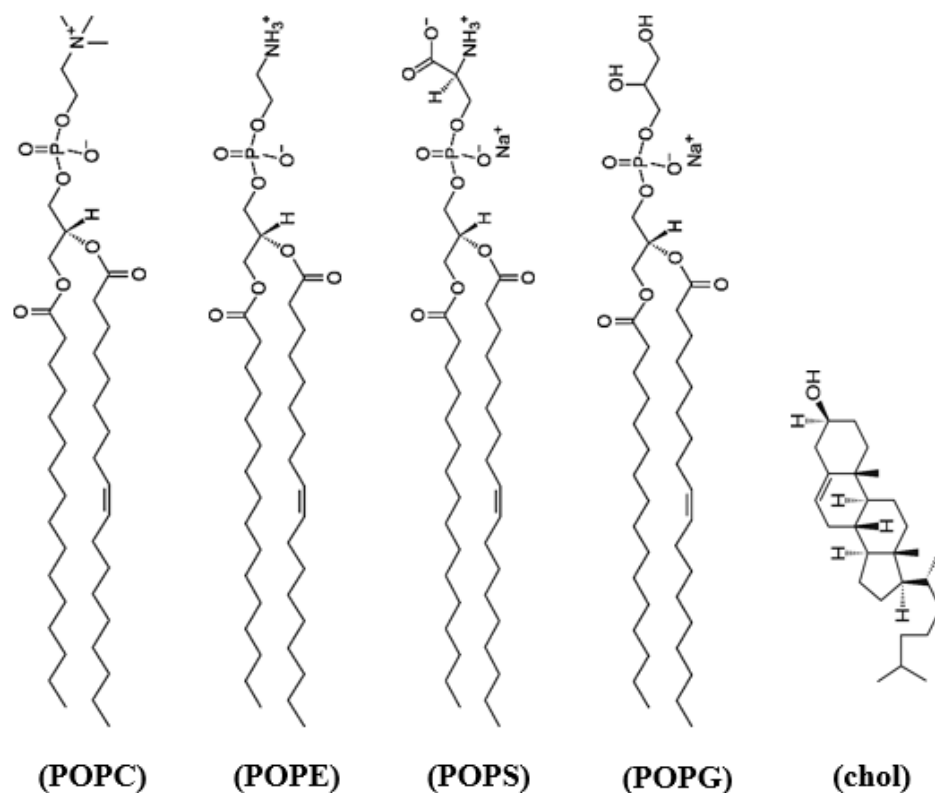
**Tableau 1.2 :** Description détaillée des chaînes acyles en position *sn*-1/2 des phosphatidylcholines qui constituent les membranes de spermatozoïdes bovins. Adapté de la référence (Selivonchick et al. 1980) avec la permission de *Elsevier*.

Chaînes acyles			
Position <i>sn</i> -1		Position <i>sn</i> -2	
Type de chaîne	% (w/w)	Type de chaîne	% (w/w)
14:0	0.5	22:4	0.5
16:0	97.8	22:5	23.4
18:0	0.8	22:6	71.9
18:1	0.5	–	–

## 1.4. Formation des membranes modèles

En raison de la complexité des membranes des spermatozoïdes, des membranes lipidiques modèles sont utilisées comme systèmes mimétiques des membranes biologiques des spermatozoïdes.

Dans la présente étude, les membranes modèles sont formées à partir de mélange binaire de phospholipides ou de cholestérol; les structures chimiques de phospholipides utilisées sont illustrées à la **Figure 1.4**. La POPC a été utilisée comme un phospholipide de référence pour les vésicules formées, puisque comme mentionné précédemment, les phosphatidylcholines sont les phospholipides les plus abondants chez les membranes des spermatozoïdes.



**Figure 1.4 :** Structure moléculaire des lipides utilisés pour la formation des membranes modèles : 1-palmitoyl-2-oléoyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine (POPC), 1-palmitoyl-2-oléoyl-*sn*-glycéro-3-phosphoéthanolamine (POPE), 1-palmitoyl-2-oléoyl-*sn*-glycéro-3-phospho-L-sérine (POPS), 1-palmitoyl-2-oléoyl-*sn*-glycéro-3- [phospho-rac-(1-glycérol)] (POPG) et cholestérol (chol).

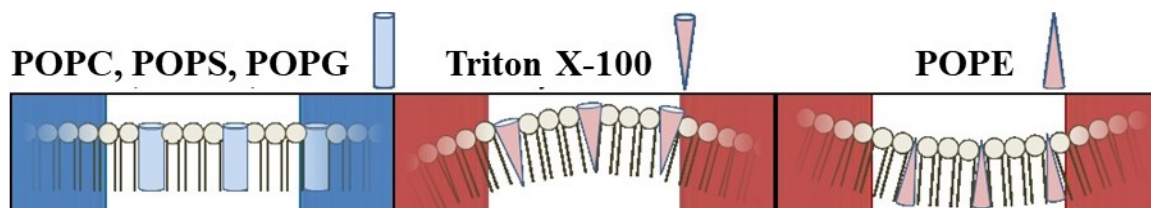
La phosphatidyléthanolamine est aussi incluse dans les membranes modèles; ce lipide conduit à la formation de structures non lamellaires qui influence les propriétés des membranes. Lorsque des lipides sont dispersés dans une solution aqueuse, ils peuvent s'auto-assembler sous différentes formes, telles que des micelles ou des bicouches (Israelachvili 1992). Cette auto-assemblage se produit une fois que la concentration en lipide dépasse une certaine concentration, appelée concentration critique d'agrégation (CAC, *Critical Aggregation Concentration*).



Les caractéristiques géométriques des lipides, y compris la longueur, le nombre et le degré d'insaturation des chaînes acyles, déterminent le type de structure obtenue (Israelachvili 1992). Le type d'agrégation formé par des molécules amphiphiles peut être prédit par le paramètre d'empilement «  $P$  »; celui-ci est généralement défini par l'équation suivante (Israelachvili et al. 1976):

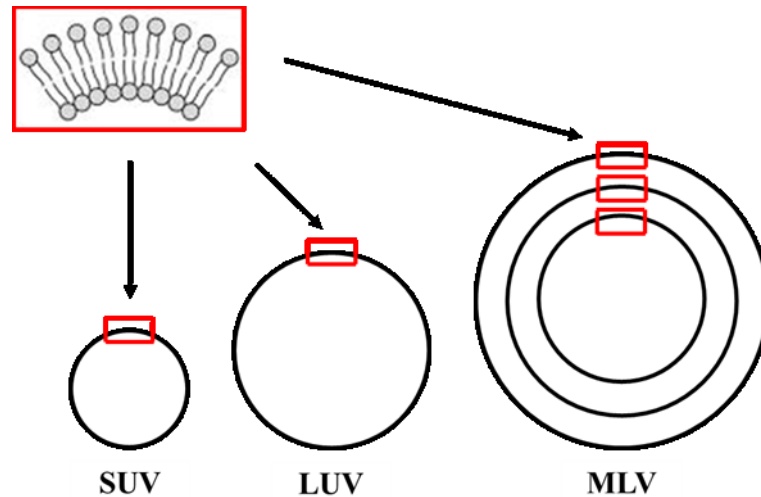
$$P = \frac{v_0}{a_0 l_0} \quad \text{Équation 1.1}$$

Où  $v_0$  est le volume occupé par la ou les chaînes hydrophobes,  $a_0$  est l'aire de la tête hydrophile à l'interface, et  $l_0$  est la longueur des chaînes acyles. À partir de ces trois paramètres, on peut caractériser la géométrie de la molécule lipidique et déterminer son comportement dans un milieu aqueux (**Figure 1.5**). Pour les amphiphiles avec une seule chaîne acyle, comme la lyso-PC et le Triton X-100, la tête polaire est relativement grande par rapport à la partie hydrophobe, menant à  $v_0 < a_0 l_0$  et donc un paramètre  $P < 1$ . Ces valeurs de  $P$  favorisent la formation des micelles. Pour le cas inverse ( $P > 1$ ), où la tête polaire est de petite taille par rapport à la partie hydrophobe, des structures en phase hexagonale inversée ( $H_{II}$ ) sont formées. La POPE possède ce type de forme conique inversée et, en conséquence, a tendance à former des phases  $H_{II}$ . Les phospholipides avec  $P$  environ égal 1, comme la POPC, la POPS et le POPG, possèdent une forme cylindrique, où la tête polaire est de taille similaire à celle de la partie hydrophobe. Ces lipides forment des bicouches. Tous les mélanges lipidiques utilisés pour les expériences de ce mémoire forment des phases lamellaires à la température de l'expérience. Cependant, la présence de lipides avec différents paramètres d'empilement affecte considérablement l'empilement des lipides dans les membranes. Cet effet peut influencer à titre d'exemple la liaison du Triton X-100 avec les membranes lipidiques (Stuart et Boekema 2007).



**Figure 1.5 :** Représentation schématique de l’effet de la géométrie de lipides sur la courbure des membranes. Adaptée de la référence (Therrien 2016) avec la permission de l’auteur.

Selon la méthode de préparation des vésicules, différents types de structures peuvent être obtenus (Gregoriadis 1991, Mui et al. 2003, Lorin et al. 2004, Uhumwangho et Okor 2005) (**Figure 1.6**). Il existe plusieurs méthodes de préparation des vésicules, telles que la méthode spontanée, la sonication, l’extrusion, etc. Lorsque les phospholipides sont hydratés en solution aqueuse, des vésicules multilamellaires (MLV, *Multilamellar Vesicles*) se forment. Ces vésicules sont composées de plusieurs bicouches lipidiques, l’une à l’intérieur de l’autre, séparées par des molécules d’eau. Leur diamètre est généralement supérieur à 0.5  $\mu\text{m}$ . L’extrusion des MLV à travers un filtre ayant des pores de taille bien définie donne lieu à la formation des grandes vésicules unilamellaires (LUV, *Large Unilamellar Vesicles*); c’est le type de vésicules utilisés dans toutes les expériences de ce mémoire. Les petites vésicules unilamellaires (SUV, *Small Unilamellar Vesicles*) sont formées par sonication de MLV. Les LUV et les SUV sont des vésicules caractérisées par la formation d’une seule bicouche lipidique. Les LUV ont un diamètre qui varie entre 100 et 1000 nm, tandis que le diamètre des SUV est inférieur à 50 nm.

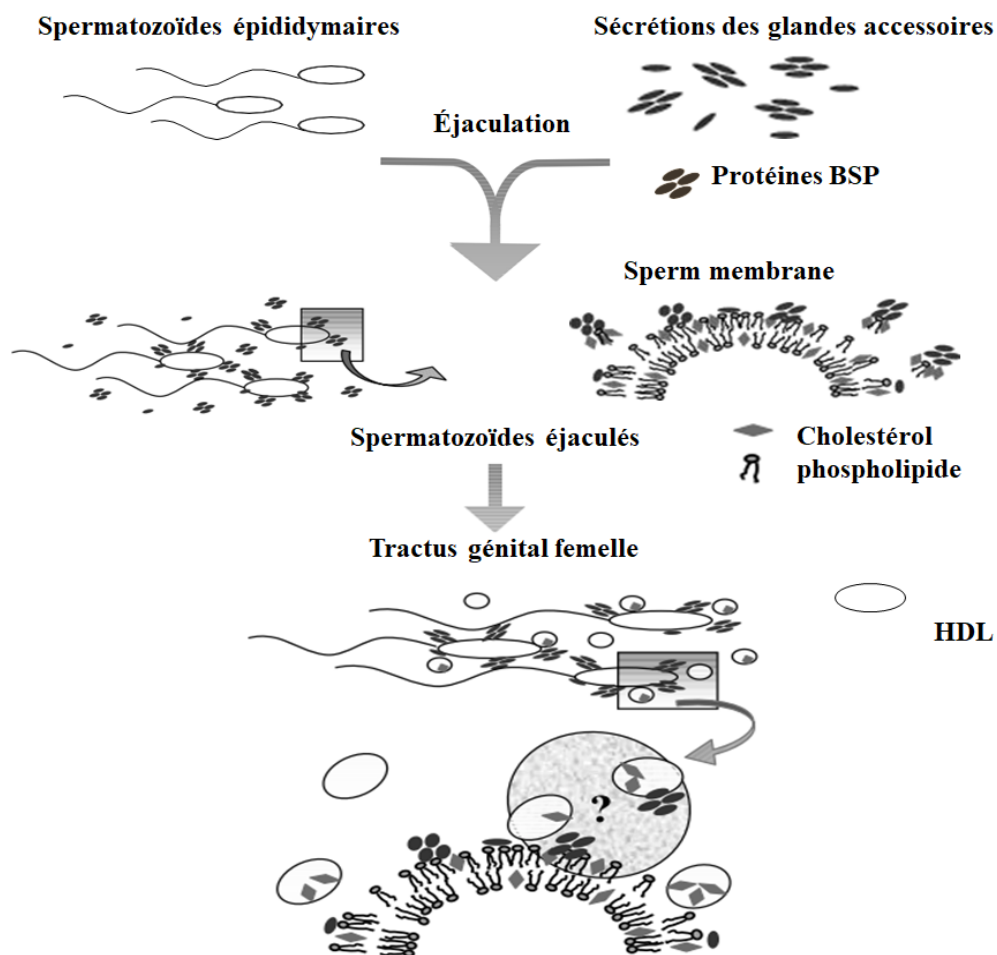


**Figure 1.6 :** Représentation schématique des différents types de vésicules. Adaptée de la référence (Kanášová et Nesměrák 2017) avec la permission de *Springer*.

## 1.5 Interaction de la BSP1 avec les membranes des spermatozoïdes

Les protéines plasmatiques des semences, en particulier les protéines BSP, participent à plusieurs étapes clés de fertilisation. Elles modulent de manière significative la formation du réservoir de spermatozoïdes dans l’oviducte, la capacitation et la réaction acrosomique (Gwathmey et al. 2003). Dans des études récentes, le groupe de Manjunath décrit un mécanisme général pour expliquer la capacitation des spermatozoïdes par les protéines BSP (Manjunath et Thérien 2002) (**Figure 1.7**). Après l’éjaculation, les spermatozoïdes sont mélangés aux sécrétions des glandes sexuelles accessoires, y compris les protéines BSP (Manjunath et al. 2007). Ces dernières recouvrent complètement les spermatozoïdes (Manjunath et al. 1994, Ramakrishnan et al. 2001). Ensuite, les protéines extraient sélectivement du cholestérol (premiers efflux de cholestérol) et des phospholipides, principalement des phosphocholines. Les lipides sont extraits avec un rapport molaire de 20 phosphocholines et 24 cholestérols par protéine (Moreau et Manjunath 1999). Après de 15 à 30 minutes d'exposition des

spermatozoïdes aux protéines, de 7 à 15 % du cholestérol membranaire est extrait et après 4 heures, environ 25 % du cholestérol est extrait. Il a été montré que l'extraction du cholestérol est plus rapide que l'extraction des phospholipides (Thérien et al. 1999). Cet efflux lipidique produit une modification de la composition lipidique de la membrane des spermatozoïdes (Clegg et Foote 1973, Moreau et al. 1998). Dans l'appareil reproducteur féminin, les spermatozoïdes auxquels sont liées des protéines BSP peuvent interagir avec les lipoprotéines de haute densité (HDL) ce qui stimule un second flux de cholestérol des membranes de spermatozoïdes (Müller et al. 1998, Gwathmey et al. 2003). Ce phénomène entraîne une diminution du ratio cholestérol/phospholipide des membranes, ce qui conduit à une diminution de la fluidité de la membrane et à sa déstabilisation (Desnoyers et Manjunath 1992, Therien et al. 1998).



**Figure 1.7 :** Mécanisme de la capacitation des spermatozoïdes bovins par les protéines BSP1.

Adaptée de la référence (Manjunath et Thérien 2002) avec la permission de *Elsevier*.

Plusieurs recherches ont été effectuées jusqu'à maintenant pour mieux comprendre les interactions entre la protéine BSP1 et les membranes des spermatozoïdes. Il a été montré que les protéines BSP1 interagissent avec les phospholipides avec une spécificité prononcée pour le type choline (PC et SM) (Desnoyers et Manjunath 1992). Elles interagissent également, dans une moindre mesure, avec le facteur d'activation plaquettaire, des phospholipides autres que la phosphocholine tels que la phosphatidyléthanolamine, la phosphatidylsérine et le phosphatidylinositol (Desnoyers et Manjunath 1992).

## 1.6 Interaction de la BSP1 et les lipides

Plusieurs études ont été effectuées afin de comprendre en détails les interactions entre les protéines BSP et les membranes lipidiques des spermatozoïdes. Tel que mentionné dans la **Section 1.2**, la tête polaire de type choline représente un site de liaison de la protéine BSP1 aux membranes (Desnoyers et Manjunath 1992). Les régions hydrophiles des deux domaines de types Fn2 sont appliquées dans la liaison de la BSP1 à la partie choline. L'association de la protéine avec la ortho-phosphorylcholine (o-PC) entraîne une modification de la structure de la protéine par rapport à sa structure à l'état libre en solution. Des expériences de spectroscopie infrarouge et de dichroïsme circulaire ont déterminé, au niveau de la structure secondaire de la protéine, une augmentation de la proportion de tours irréguliers, au dépend de la structure désordonnée, lorsque la protéine se lie à l'o-PC (Gasset et al. 1997). La liaison de l'o-PC induit aussi la dissociation des agrégats de BSP1 et conduit à la formation de dimères (Calvete et al. 1999). Des études cristallographiques combinées à des simulations de dynamique moléculaire ont révélé le mécanisme d'interaction du complexe BSP1 avec la phosphorylcholine (Wah et al. 2002, Kim et al. 2010). La liaison entre la BSP1 et la tête choline des phospholipides est basée sur une interaction cation- $\pi$  entre l'ammonium quaternaire de la choline et le cycle indole aromatique d'un résidu de tryptophane en position 47, 93 et 106 de la BSP1 (Wah et al. 2002). En outre, la liaison entre la BSP1 et la phosphatidylcholine est stabilisée par une liaison hydrogène du groupe -OH de résidus tyrosine en position 30, 54, 75 et 100 de la BSP1 et le groupe phosphate de la phosphatidylcholine (Wah et al. 2002).

L'affinité spécifique de la BSP1 pour les phospholipides de type choline a été confirmée par plusieurs techniques telles que des expériences de fluorescence intrinsèque de la BSP1

(Müller et al. 1998, Gasset et al. 2000), la résonance paramagnétique électronique (RPE) (Ramakrishnan et al. 2001) et la résonance plasmonique de surface (SPR) (Thomas et al. 2003). Cependant, l'interaction de la BSP1 avec lyso-PC (une chaîne acyle) est environ 250 fois plus forte qu'avec la phosphorylcholine (pas de chaîne acyle) (Desnoyers et Manjunath 1992). De manière similaire, la diacyl- phosphatidylcholine (diacyl-PC) a une affinité pour la BSP1 qui est environ 3 ordres de grandeur plus forte que la lyso-PC (Desnoyers et Manjunath 1992). Ceci implique que, bien que le groupe choline soit important pour la spécificité de l'interaction, la partie hydrophobe du lipide est également importante pour l'association de la protéine (Anbazhagan et Swamy 2005). Des études en RPE ont montré la pénétration de la protéine BSP1 dans la partie hydrophobe de la membrane lors de sa liaison, induisant une diminution de la mobilité des chaînes acyles des phospholipides jusqu'au carbone 14, soit presque au centre de la bicouche (Ramakrishnan et al. 2001). Ces études ont utilisé des phospholipides marqués par un groupe de nitroxyde, ajoutés en faible proportion (1% mol/mol) à une matrice de 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine (DMPC).

Les études de la fluorescence intrinsèque de la protéine, de RPE et de SPR montrent toutes que l'affinité de la protéine BSP1 pour les membranes de PC est diminuée par la présence de la PE, du PG ou de la PS. La composition lipidique influence donc directement l'association de la protéine BSP1 avec les membranes (Ramakrishnan et al. 2001, Thomas et al. 2003). Les études RPE ont montré que l'ordre d'affinité de la protéine BSP1 pour différents lipides membranaires est :  $PC > PG \approx PS > PE \gg \text{cholestérol}$  (Ramakrishnan et al. 2001). Des études en SPR ont déterminé un ordre d'affinité similaire avec des monocouches lipidiques:  $PC > PG > PE$  (Thomas et al. 2003). L'influence du cholestérol sur l'association de la protéine BSP1 avec les membranes a également été examinée; à ce point, elle est controversée. Il a été

montré que le cholestérol ne semble pas interagir directement avec les protéines BSP1 (Desnoyers et Manjunath 1992, Moreau et Manjunath 1999, Müller et al. 2002). Swamy et ses collaborateurs ont proposé que le cholestérol augmente l'affinité de la protéine BSP1 pour les vésicules de DMPC (Swamy et al. 2002); il est proposé que le cholestérol offre de nouveaux sites de liaison à la protéine. Cependant, des études en RPE ont démontré que l'insertion du cholestérol dans les membranes de DMPC a entraîné une diminution de l'affinité de la protéine pour les membranes (Ramakrishnan et al. 2001). Des études en titrage calorimétrique isotherme (ITC) ont indiqué que la présence du cholestérol dans les membranes de PC provoque une diminution de la capacité de liaison de la protéine avec les membranes (Lassiseraye et al. 2008). Il a été montré que le cholestérol empêche les perturbations membranaires induites par la liaison de la protéine avec les membranes de PC (Gasset et al. 2000). Ces observations sont rationalisées par le fait que la présence du cholestérol augmente la rigidité des membranes (Douliez et al. 1996, Li et al. 2001) et limite ainsi l'insertion de la protéine.

La littérature rapporte diverses structures et tailles d'auto-assemblages résultant de l'interaction de la BSP1 avec les membranes lipidiques. Des études en microscopie électronique rapportent une réduction de la taille des vésicules et la formation de différentes formes de particules lors de l'association de la BSP1 avec les membranes. Par exemple, Gasset et collaborateurs ont montré la formation de complexes ayant un diamètre d'environ 10 à 40 nm lorsque la protéine interagit avec des LUV de DOPC à un ratio molaire de 50 lipides par protéine (Gasset et al. 2000). Lafleur et ses collaborateurs ont observé que, lorsque la protéine se lie à des grosses vésicules (LUV de 100 nm de diamètre) de POPC à un ratio molaire de 48:1 POPC/BSP1, elle induit la formation de protubérances aux vésicules, de structures en collier de perles, de petites vésicules ayant un diamètre allant jusqu'à 15 nm, et de longs fils spiralés



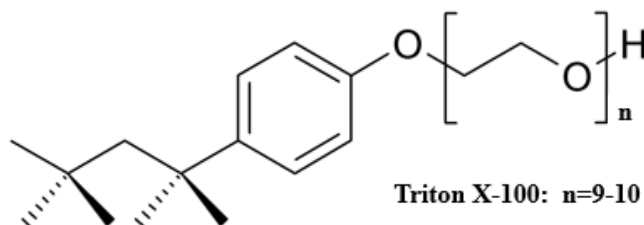
(Lafleur et al. 2010). Ces derniers ont été proposés être des complexes lipide/BSP1 riches en protéine car leur proportion augmente lorsque la quantité de protéine augmente. Lorsque le lipide existe sous forme de liposomes multilamellaires (MLV), de longs tubes dont la longueur peut atteindre 0.1 mm sont aussi formés. Il a aussi été montré que la BSP1 a la capacité de transformer les dispersions multilamellaires de POPC en entités plus petites qu'on ne peut pas faire culotter par centrifugation POPC (Therrien et al. 2013). Les travaux de ce mémoire visent aussi à définir les changements morphologiques des membranes modèles par la BSP1.

## 1.7 Triton X-100

Les détergents sont des molécules amphiphiles avec une partie hydrophobe et une partie hydrophile. Ils ont la capacité de s'agréger, regroupant leur partie hydrophobe pour former une région apolaire, tout en exposant leur partie polaire au milieu aqueux. À de faibles concentrations, les détergents en solution aqueuse se présentent sous forme de monomères. À des concentrations plus élevées, ils s'auto-assemblent en micelles. La concentration à laquelle l'aggrégation débute est appelée la concentration micellaire critique (CMC, *Critical Micelle Concentration*). À la CMC, il y a un changement brusque dans les propriétés physiques de la solution. Selon la nature du groupement hydrophile des détergents, ils peuvent être classés comme non ioniques, ioniques et zwitterioniques. Les travaux du **Chapitre 3** se concentrent sur le Triton X-100; nous avons examiné l'impact de ce détergent sur la morphologie des membranes modèles, une étape préliminaire à la caractérisation de l'impact de la BSP1 à ce niveau (**Figure 1.8**).

Le Triton X-100 (TX-100) est un détergent neutre, qui contient un groupe 4-(1,1,3,3-tétraméthylbutyl)-phényle comme partie hydrophobe et un groupe polyoxyéthylène comme

partie hydrophile. Il a une valeur de CMC de 0.25 mM (Egan 1976), et forme des micelles d'un diamètre moyen de 9 nm (López et al. 1999). En raison de la structure moléculaire conique des détergents (voir **Section 1.4**) (Israelachvili et al. 1980), l'auto-assemblage de ces molécules possède une courbure spontanée positive (Helfrich 1973). Celles-ci sont donc capables de former de petites particules avec des surfaces fortement incurvées, les micelles. Les micelles formées par le TX-100 peuvent être à la fois de types réguliers ou inversés, dépendant de la polarité du milieu. Par exemple, le TX-100 forme des micelles régulières dans l'eau (Paradies 1980) et des micelles inversées dans un liquide organique (comme le benzène) (Partearroyo et al. 1996).



**Figure 1.8 :** Structure moléculaires générale du Triton-X100 (n est le nombre d'oxyde d'éthylène polymérisé).

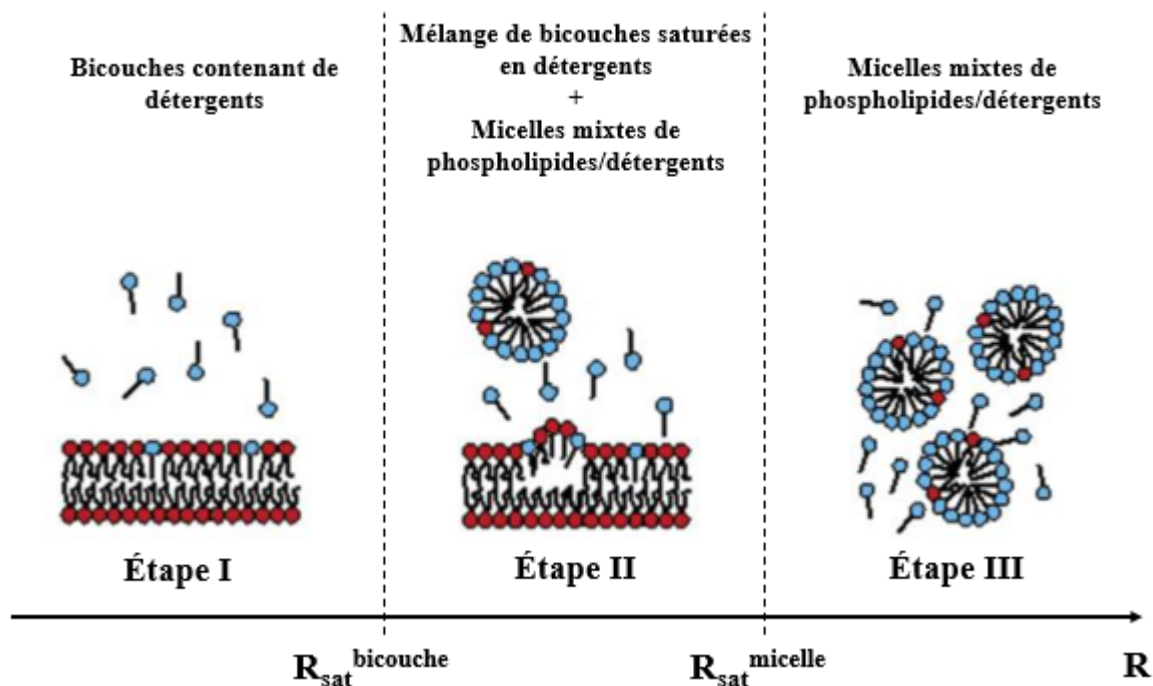
## 1.8 Interaction lipides/TX-100

La solubilisation de la bicouche est la transformation de celle-ci en micelles par un détergent. La reconstitution de membranes lipidiques est le phénomène inverse; il correspond au passage de micelles de détergents à des bicouches lorsque des liposomes sont ajoutés à des micelles de détergent. Ces deux phénomènes sont d'une importance fondamentale en biochimie

et biophysique des membranes. Le TX-100 a été choisi pour cette étude car il est neutre et un bon agent solubilisant de vésicules lipidiques (Partearroyo et al. 1996).

Les mécanismes de solubilisation et de reconstitution des membranes biologiques et modèles ont été largement étudiés (López et al. 1998, le Maire et al. 2000, Ollivon et al. 2000, Ahyayauch et al. 2006). La transformation des bicouches lipidiques en micelles par le TX-100 se produit par le mécanisme de solubilisation le plus commun, sans formation d'agréats intermédiaires (López et al. 1998). Celui-ci comporte trois domaines (**Figure 1.9**) (Helenius et Simons 1975): i) dans un premier temps, à des concentrations faibles en détergent, des monomères de détergents sont incorporés dans les vésicules lipidiques jusqu'à leur saturation ; ii) une perturbation de la structure lamellaire par le détergent induit la coexistence de vésicules saturées en détergent en équilibre thermodynamique avec des micelles mixtes lipide/détergent ; iii) dans la dernière étape, les vésicules lipidiques sont complètement solubilisées par le détergent pour former des micelles mixtes de lipide/détergent. La limite entre ces trois domaines est caractérisée par deux valeurs mesurables du rapport molaire détergents/lipides ( $R$ ) (Lichtenberg et al. 1983, Schurtenberger et al. 1985, De la Maza et Parra 1994, Schnitzer et al. 2003). La limite de saturation de bicouches ( $R_{\text{sat}}^{\text{bicouche}}$ ) représente le rapport molaire détergents/lipides lorsque la bicouche est saturée en détergent. Il est obtenu, dans notre étude, à partir de la concentration de détergent à laquelle les micelles mixtes commencent à se former à laquelle on soustrait la CMC du détergent car nous supposons qu'une quantité équivalente de détergent reste sous forme monomère, divisée par la concentration de lipide. La limite de saturation de micelles mixtes de détergents ( $R_{\text{sat}}^{\text{micelle}}$ ), quant à elle, identifie le rapport molaire détergent/lipide dans les micelles saturées en lipide. Il est obtenu à partir de la concentration en détergent à laquelle la reconstitution de bicouches commence à laquelle on soustrait la CMC du

détergent, divisée par la concentration en lipide. Ces deux paramètres, qui caractérisent la solubilisation et la reconstitution des bicouches lipidiques, dépendent de plusieurs facteurs dont la température et la phase lipidique (Schnitzer et al. 2003).



**Figure 1.9 :** Les trois domaines de la solubilisation des vésicules par le détergent.  $R_{sat}^{bicouche}$  et  $R_{sat}^{micelle}$  définissent respectivement le rapport de saturation des bicouches et des micelles, ces deux paramètres représentent la limite de la coexistence des bicouches saturées en détergents et des micelles mixtes de détergents/lipides.

L'influence de la composition lipidique sur le processus de solubilisation par le TX-100 a été étudiée. Ahyayauch et ses collaborateurs ont étudié l'effet de la composition lipidique sur la solubilisation à l'aide d'expériences en turbidimétrie (Ahyayauch et al. 2006). Ils ont trouvé que l'augmentation de la longueur de chaîne de phospholipides saturés entraîne une augmentation du rapport  $R_{sat}^{bicouche}$ , tandis que l'insertion d'une double liaison dans les chaînes

de phospholipides induit une diminution de ce rapport. Il a été montré que la solubilisation des bicouches par le TX-100 est inhibée par la présence du cholestérol dans les membranes (Li et al. 2001, Sot et al. 2002, Ahyayauch et al. 2009). Lorsqu'il est ajouté aux membranes de sphingomyéline en phase gel, le cholestérol réduit l'insertion du TX-100 dans les membranes. Ceci suggère que le cholestérol peut entraîner la formation de domaines lipidiques en phase liquide ordonnée qui sont résistants au TX-100 (Simons et Vaz 2004, Mattei et al. 2014). Des études par turbidimétrie montrent que la solubilisation de bicouches de PC par TX-100 est réduite lorsque la PE est présente dans la membrane (Urbaneja et al. 1987). Cette étude propose aussi que la présence d'un lipide chargé négativement, comme la cardiolipine, ne produit aucun effet sur le processus de la solubilisation.

Dans le mémoire, la solubilisation et la reconstitution des membranes lipidiques par le TX-100 ont été investiguées à l'aide de la diffusion dynamique de la lumière pour comprendre l'influence de la composition lipidique sur ce processus.

## **1.9 Fluorescence intrinsèque de la BSP1**

Les protéines de BSP1 absorbent fortement la lumière ultraviolette (UV) à environ 280 nm. Ce sont les acides aminés aromatiques de la protéine qui sont responsables de cette absorption. La fluorescence intrinsèque de la protéine BSP1 est due à la présence de trois acides aminés aromatiques : tryptophane (Trp), tyrosine (Tyr) et phénylalanine (Phe). Dans la protéine BSP1, la fluorescence est dominée par la présence des Trp car leur coefficient d'absorption à environ 280 nm et leur rendement quantique sont considérablement supérieurs aux valeurs de ceux de la Tyr et de la Phe, comme le montre le **Tableau 1.3** (Ghisaidoobe et Chung 2014). De plus, l'énergie absorbée par les phénylalanines et les tyrosines est souvent transférée aux résidus

de tryptophane dans la même protéine. Le spectre d'excitation est dû principalement à la transition  $\pi \rightarrow \pi^*$  du groupe indole du tryptophane.

**Tableau 1.3 :** Propriétés de fluorescence des acides aminés aromatiques dans l'eau à pH neutre. Les longueurs d'onde maximales d'absorption et d'émission sont indiquées comme  $\lambda_{\max}$ , le coefficient d'absorption molaire est indiqué comme  $\epsilon_{\max}$  et  $\Phi_{\max}$  indique le rendement quantique de fluorescence. Adapté de la référence (Ghisaidoobe et Chung 2014) avec la permission de *Multidisciplinary Digital Publishing Institute*.

Acide aminé	Absorption		Fluorescence	
	$\lambda_{\max}$ (nm)	$\epsilon_{\max}$ ( $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )	$\lambda_{\max}$ (nm)	$\Phi_{\max}$
Tryptophane	280	5600	348	0.2
Tyrosine	274	1400	303	0.14
Phénylalanine	257	200	282	0.04

La fluorescence du tryptophane est très sensible à la polarité du milieu et peut être utilisée pour caractériser l'affinité de la protéine pour les membranes. Lorsque la protéine est libre dans un milieu aqueux (tampon), l'environnement des résidus aromatique de la BSP1 est très polaire. Par contre, lorsque la BSP1 se lie aux membranes modèles, la polarité du milieu où se trouvent les tryptophanes de la BSP1 diminue puisque l'intérieur des membranes est moins polaire que le tampon. Ainsi, il est possible de suivre les déplacements hypsochromiques du maximum d'émission et les variations de l'intensité de fluorescence afin de caractériser les changements d'environnement de ces fluorophores.

L'affinité de la protéine BSP1 pour les membranes lipidiques a été mesurée en suivant l'évolution de spectres de fluorescence de la protéine en présence de lipides. Cette affinité est quantifiée en utilisant un modèle de partage où on considère que la protéine se partage entre une phase lipidique et une phase aqueuse. L'analyse des résultats est basée sur les travaux de

Ladokhin et collaborateurs (Ladokhin et al. 2000). La constante d'affinité ( $K_X$ ) de la protéine pour la phase lipidique relativement à la phase aqueuse peut être exprimée selon le modèle suivant :

$$K_X = \frac{\frac{[BSP1]_{Liée}}{[L]}}{\frac{[BSP1]_{Libre}}{[W]}} \quad \text{Équation 1.2}$$

Où  $[BSP1]_{Liée}$  représente la concentration molaire de la protéine BSP1 liée aux vésicules lipidiques,  $[BSP1]_{Libre}$  représente la concentration molaire de la protéine BSP1 libre en solution,  $[L]$  est la concentration lipidique et  $[W]$  représente la concentration molaire de l'eau (55.3 M). Étant donné que  $[BSP1]_{Totale} = [BSP1]_{Liée} + [BSP1]_{Libre}$ , on peut calculer facilement la fraction de la protéine liée,  $f_p$  :

$$f_p = \frac{[BSP1]_{Liée}}{[BSP1]_{Totale}} = \frac{K_X [L]}{K_X [L] + [W]} \quad \text{Équation 1.3}$$

L'intensité de fluorescence dans les expériences de titrage,  $F$ , a été mesurée à environ 315 nm, la longueur d'onde où la variation d'intensité entre les formes libre et liée de la protéine est maximale. L'intensité de fluorescence mesurée correspond à la contribution des formes libre et liée de la protéine. Si on normalise les intensités de fluorescence,  $F$ , par la valeur obtenue en l'absence de lipides,  $F_0$ , (c'est-à-dire quand l'intensité correspond uniquement à la forme libre de la protéine), la  $f_p$  peut être définie en fonction de l'intensité de la fluorescence par l'équation suivante :

$$f_p = \frac{\frac{F}{F_0} - 1}{\frac{F_{\infty}}{F_0} - 1} \quad \text{Équation 1.4}$$

Où  $F_{\infty}$  représente l'intensité de la fluorescence lorsque toute la BSP est liée aux lipides. Les **Équations 1.3 et 1.4** sont combinées pour obtenir l'**Équation 1.5** que permet de modéliser l'augmentation de fluorescence lors du titrage de la protéine avec des lipides pour déterminer l'intensité relative lors de la liaison complète de la protéine,  $\frac{F_{\infty}}{F_0}$ , et  $K_x$ .

$$\frac{F}{F_0} = 1 + \left( \frac{F_{\infty}}{F_0} - 1 \right) \frac{K_x [L]}{K_x [L] + [W]} \quad \text{Équation 1.5}$$

Cette approche a été utilisée dans le mémoire pour déterminer la valeur du  $K_x$  de la BSP1 pour des bicouches avec différentes compositions lipidiques.

## 1.10 Diffusion dynamique de la lumière

La diffusion dynamique de la lumière (DLS, *Dynamic Light Scattering*), également appelée spectroscopie par corrélation de photons ou diffusion quasi-élastique de la lumière, est basée sur le mouvement brownien des particules dispersées. Lorsque les particules sont dispersées dans un liquide, elles se déplacent de façon aléatoire dans toutes les directions. La DLS mesure les mouvements browniens à une échelle submicrométrique et les relie à la taille des particules. Les plus petites particules se déplacent à des vitesses plus élevées que les plus grosses. La relation entre le coefficient de diffusion translationnelle,  $D$ , des particules et leur taille est donnée par l'équation de Stokes-Einstein (**Équation 1.6**). La diffusion est généralement influencée par trois facteurs principaux: la température, la viscosité du solvant et la taille des particules. Si les deux premiers paramètres sont connus (et constants), la fluctuation de l'intensité de la lumière diffusée ne dépend que de la taille des particules.

$$d(H) = \frac{k T}{6 \pi \eta D} \quad \text{Équation 1.6}$$

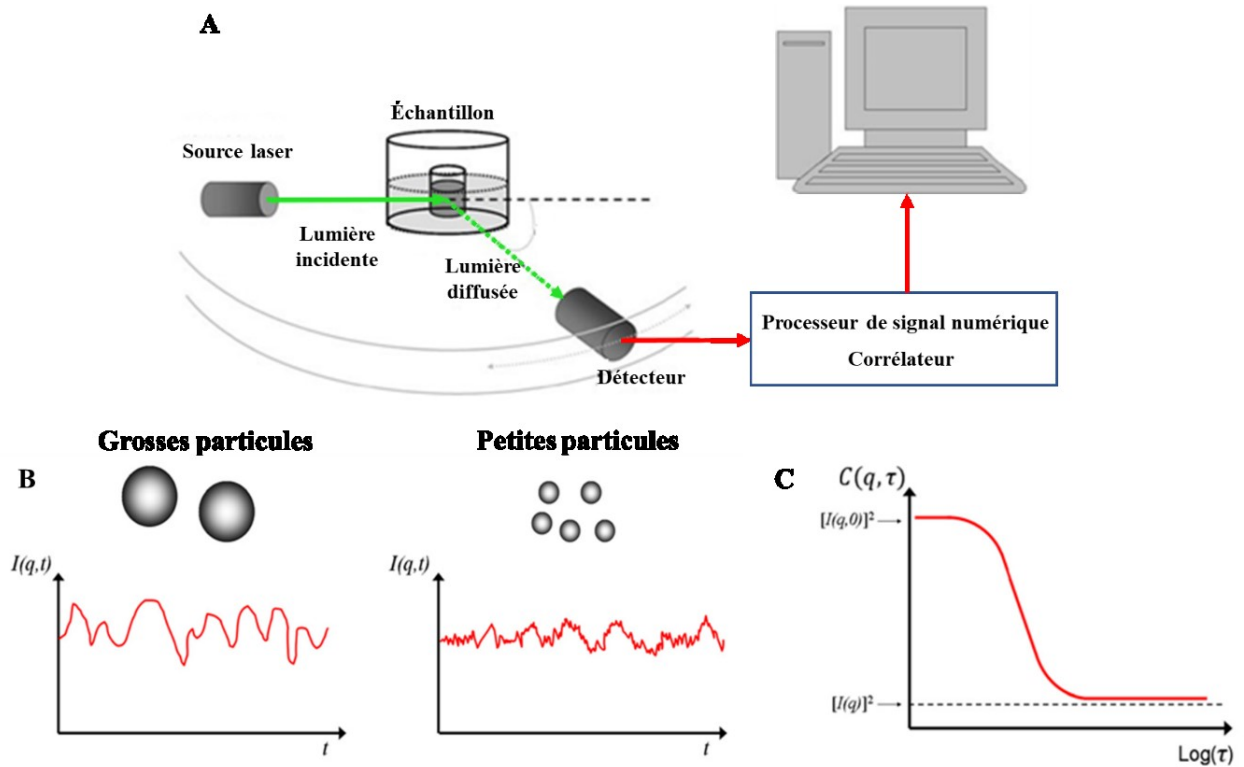


Où  $d(H)$  est le diamètre hydrodynamique des particules,  $k$  représente la constante de Boltzmann,  $T$  correspond à la température absolue,  $\eta$  la viscosité du milieu et  $D$  représente le coefficient de diffusion translationnelle. Il faut noter que cette équation suppose que la particule est une sphère indéformable, une hypothèse qui est plus ou moins respectée dans notre cas, comme nous le verrons plus tard. La lumière diffusée est détectée sur une certaine période de temps afin de caractériser le mouvement des particules (**Figure 1.10A**). L'intensité de la lumière diffusée n'est pas constante, mais elle varie avec le temps. Les particules plus petites, qui se déplacent à des vitesses plus élevées, engendrent des fluctuations de lumière diffusée plus rapides que les particules plus grosses. D'autre part, les particules plus grosses entraînent des amplitudes plus élevées entre les intensités de diffusion maximale et minimale, comme le montre les courbes d'intensité illustrées à la **Figure 1.10B**. Ces courbes sont ensuite utilisées pour générer la fonction de corrélation. Cette fonction décrit le temps qu'une particule passe au même endroit dans l'échantillon. Les algorithmes de cumul sont utilisés afin d'ajuster la fonction de corrélation (**Figure 1.10C**). Le coefficient de diffusion translationnelle est déterminé à partir de l'algorithme de cumulatif pour obtenir la distribution de taille des particules. Les résultats permettent de déterminer la taille et l'indice de polydispersité (PDI). Le PDI est défini comme une mesure de l'homogénéité de la taille des particules. Ce paramètre est obtenu à l'aide de l'équation suivante:

$$PDI = \frac{\langle d(H)^2 \rangle}{\langle d(H) \rangle^2} \quad \text{Équation 1.7}$$

Où  $\langle d(H)^2 \rangle$  est la valeur moyenne des carrées de diamètres, et  $\langle d(H) \rangle^2$  est le carré de la moyenne arithmétique des diamètres. Il est convenu qu'une valeur de PDI inférieure à 0.3 indique que la population des particules est homogène. Dans la mémoire, la DLS a été utilisée

pour la vérification de la taille des vésicules extrudées ainsi que pour la détermination de la distribution de taille des particules pendant la solubilisation et la reconstitution membranaires par Triton X-100 et pour le titrage des vésicules de POPC par la protéine BSP1.



**Figure 1.10 :** **A)** Représentation schématique du montage de l'appareillage de diffusion dynamique de la lumière. **B)** Fluctuation de l'intensité de la lumière diffusée avec le temps. **C)** Évolution de la fonction d'autocorrélation. Adaptée de la référence (Lim et al. 2013) avec la permission de *Springer*.

## Chapitre 2 : Étude fluorométrique des interactions entre la BSP1 et les membranes modèles

### 2.1 Introduction

Cette section visait à étudier les interactions entre la protéine BSP1 et les membranes modèles, afin de mieux comprendre l'action de la BSP1 sur les membranes des spermatozoïdes. La détermination de la constante d'affinité entre la BSP1 et quatre membranes modèles a été réalisée à l'aide de la spectroscopie de fluorescence.

### 2.2 Matériel et méthodes

#### 2.2.1 Matériel

La protéine BSP1 est fournie par le laboratoire du docteur Puttaswamy Manjunath du centre de recherche de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont (Montréal, Canada). La protéine est isolée selon un protocole décrit dans la littérature (Manjunath et Sairam 1987, Manjunath et al. 1987). La protéine lyophilisée est conservée à une température de -20 °C jusqu'à l'utilisation.

La POPC, la POPE et la POPS ont été obtenues sous forme solide d'*Avanti Polar Lipids* (Birmingham, AL, USA). Le cholestérol (99% minimum), l'acide 3-morpholino-1-propanesulfonique (MOPS), l'acide L-ascorbique, et l'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA) proviennent de chez *Sigma-Aldrich* (Oakville, Canada). Le benzène, le molybdate d'ammonium, et le méthanol de lavage ont été obtenus de *BDH Chemicals Inc.* L'acide acétique glacial et l'acide sulfurique (95-98%) ont été achetés chez *Acros Organics*. Le chlorure de sodium provient chez *Amresco Inc.*

### 2.2.2 Préparation des LUV

Les LUV utilisées dans les expériences de fluorescence ont été préparées par extrusion (Batzri et Korn 1973, McKnight et al. 1991). Les liposomes étaient composés de POPC et d'un mélange de lipides avec différents rapports molaires : POPC/chol (7/3 et 9/1), POPC/POPE (5/5, 7/3, et 9/1) ou POPC/POPS (5/5, 7/3, et 9 /1).

Les mélanges lipidiques ont été préparés en prenant une quantité connue de chaque phospholipide dissout dans le benzène puis en mélangeant des volumes appropriés pour obtenir la proportion molaire désirée. Ensuite, le benzène a été évaporé à l'aide d'un lyophilisateur, pendant au moins 16 h, afin d'assurer l'absence totale de traces de solvant organique; l'échantillon formait un poudre lipidique homogène. Les MLV ont été obtenues par l'hydratation de la poudre résultante avec un tampon MOPS, pH 7.4 (50 mM MOPS, 50 mM NaCl, 0.1 mM l'EDTA, préparé dans l'eau ultra-pure (18.2 MΩ cm)). Le pH a été ajusté au besoin avec une solution diluée de HCl. La concentration en lipide était d'environ 500 μM. Puis, cinq cycles de congélation-décongélation ont été effectués sur la suspension de MLV, suivis de l'extrusion de la suspension lipidique en utilisant un extrudeur manuel (*Avestin*, Ottawa, ON) avec un filtre de polycarbonate ayant des pores de 100 nm de diamètre, visant à l'homogénéisation de la taille des vésicules.

Le diamètre moyen des LUV utilisées dans toutes les expériences a été déterminé par analyse DLS à l'aide d'un appareil *Zetasizer Nano* (*Malvern Instruments, Worcestershire, UK*). Les mesures ont été effectuées avec un volume total de 1000 μl dans des cuvettes en polystyrène.

Les dosages en phosphate des échantillons lipidiques ont permis de déterminer la concentration exacte des lipides. Le protocole utilisé est celui proposé par (Bartlett 1959).

### 2.2.3 Préparation et quantification de la protéine

La BSP1 a été hydratée avec le tampon MOPS pH 7.4. La concentration finale en protéine était d'environ 1.1  $\mu\text{M}$ . Un spectrophotomètre (UV-Vis-NIR *Cary Serie, Agilent Technologies*) a été utilisé pour déterminer la concentration en protéines. La concentration a été déterminée en utilisant l'absorbance de l'échantillon mesurée à 280 nm et le coefficient d'extinction molaire de 36 000  $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$  (Gasset et al. 1997).

### 2.2.4 Titrage fluorométrique

Les études de fluorescence incluses dans ce mémoire ont été réalisées avec un spectrofluorimètre (*Photon Technology International*) équipé d'une lampe au xénon de 75 W comme source à l'excitation.

La liaison entre la protéine et les vésicules a été déterminée par fluorescence. A cette fin, les titrages ont été effectués en ajoutant des fractions aliquotes de suspension de LUV lipidiques à une solution de BSP1 sous agitation dans une cuvette en quartz de 1 cm x 1 cm. Le spectre de fluorescence était enregistré après chaque addition de LUV. La longueur d'onde à l'excitation était 280 nm (excitation du tryptophane) et le spectre de fluorescence a été enregistré de 295 à 450 nm, avec une vitesse de balayage de 4 nm/s. Les largeurs des bandes passantes étaient respectivement de 5.2 et 4.4 nm pour les monochromateurs d'excitation et d'émission. Les titrages ont été effectués à 25 °C, et la température de l'échantillon était contrôlée par un bain d'eau circulante.

### 2.2.5 Analyses statistiques

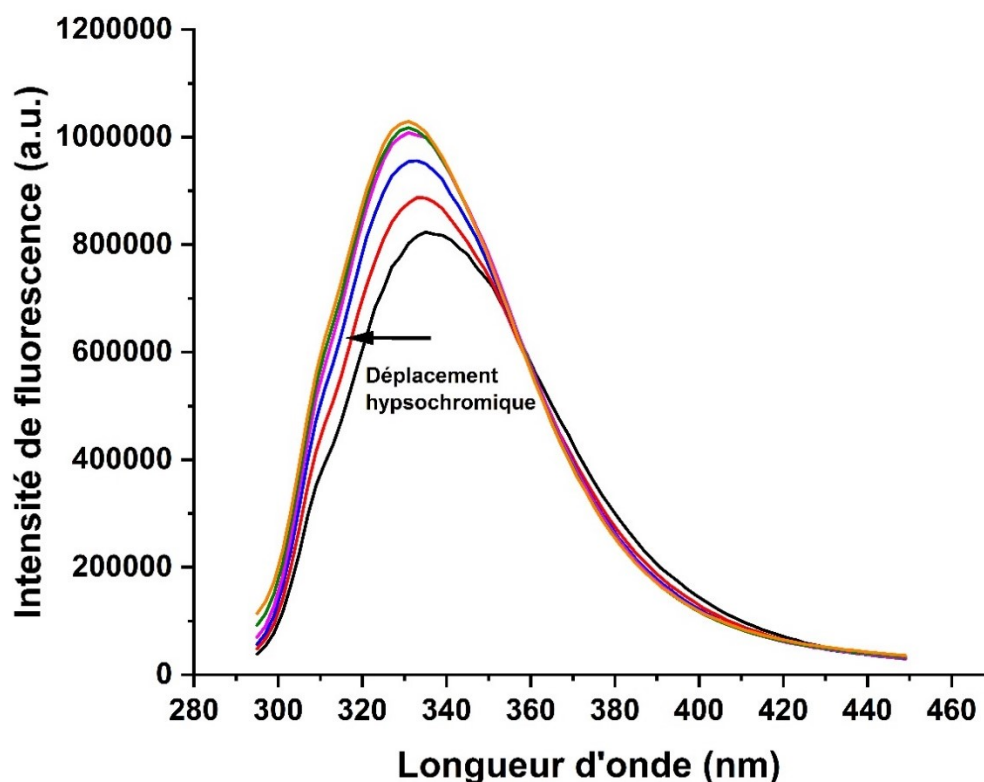
Les analyses des données ont été effectuées à l'aide du programme *Origin®* version 92E, (*Originlab*). Les résultats expérimentaux sont exprimés sous forme de moyennes pondérées,

accompagnées de l'écart-type (moyenne  $\pm$  écart-type) de duplicata. Les mesures d'intensité tiennent compte de la dilution de la protéine lors du titrage.

## 2.3 Résultats

Pour étudier la liaison de la protéine BSP1 aux membranes lipidiques, les changements de la fluorescence intrinsèque de la protéine ont été analysés lors de titrages effectués avec des vésicules lipidiques de compositions différentes [POPC, POPC/chol (7/3 ; 9/1 (mol/mol)), POPC/POPE (5/5 ; 7/3 ; 9/1 (mol/mol)), POPC/POPS (5/5 ; 7/3 ; 9/1 (mol/mol))].

Les spectres d'émission de la BSP1 enregistrés pour la protéine dans le tampon et en présence de concentrations croissantes des vésicules lipidiques de POPC sont présentés à la **Figure 2.1**. La longueur d'onde du maximum de la bande de fluorescence de la protéine dans le tampon varie entre 335 et 336 nm. Cette valeur montre que l'environnement des résidus aromatiques de la BSP1 (tryptophane, tyrosine, phénylalanine) est hautement polaire, ce qui est cohérent avec le fait qu'elle se trouve dans une solution aqueuse.



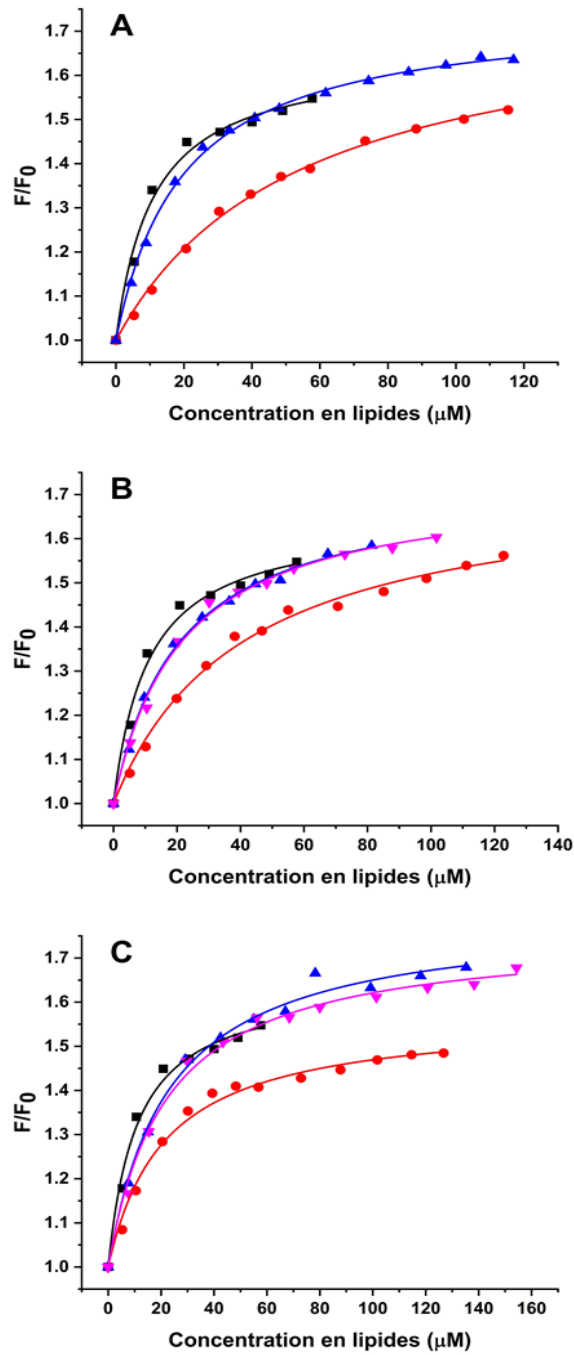
**Figure 2.1 :** Spectres d'émission de fluorescence de la BSP1 (initialement 1.01  $\mu\text{M}$ ) en fonction de différentes concentrations de POPC : 0 (—), 5.4 (—), 11 (—), 21 (—), 40 (—) et 58  $\mu\text{M}$  (—). Les spectres ont été enregistrés à 20 °C.

En présence de vésicules de POPC, nous avons observé une augmentation de l'intensité de fluorescence ainsi qu'un décalage du maximum de fluorescence ( $\lambda_{\text{max}}$ ) vers des longueurs d'onde plus courtes. Ce déplacement hypsochromique reflète un changement d'environnement du tryptophane, d'un environnement polaire vers un environnement apolaire dû à la liaison de la protéine avec les membranes lipidiques (Müller et al. 1998). Ainsi, ces changements suggèrent l'insertion de la protéine dans la région des chaînes acyles de la bicouche lipidique. La forme spectrale obtenue pour le titrage de la protéine avec les mélanges POPC/chol,

POPC/POPE et POPC/POPS est similaire à celle observée pour des LUV de POPC pure (figures non illustrées).

Les graphiques présentés à la **Figure 2.2** illustrent les différentes courbes de titrages de la protéine BSP1 par les LUV. Chaque courbe montre la variation de l'intensité de fluorescence relative ( $F/F_0$ ) en fonction de la concentration en lipide, où  $F$  est l'intensité de fluorescence mesurée et  $F_0$  représente l'intensité de fluorescence en absence de lipides. Les courbes sont obtenues en simulant les données expérimentales avec l'**Équation 1.5** (voir **Section 1.9**). Ces courbes permettent d'obtenir la constante d'affinité entre la protéine BSP1 et les membranes modèles (Ladokhin et al. 2000).

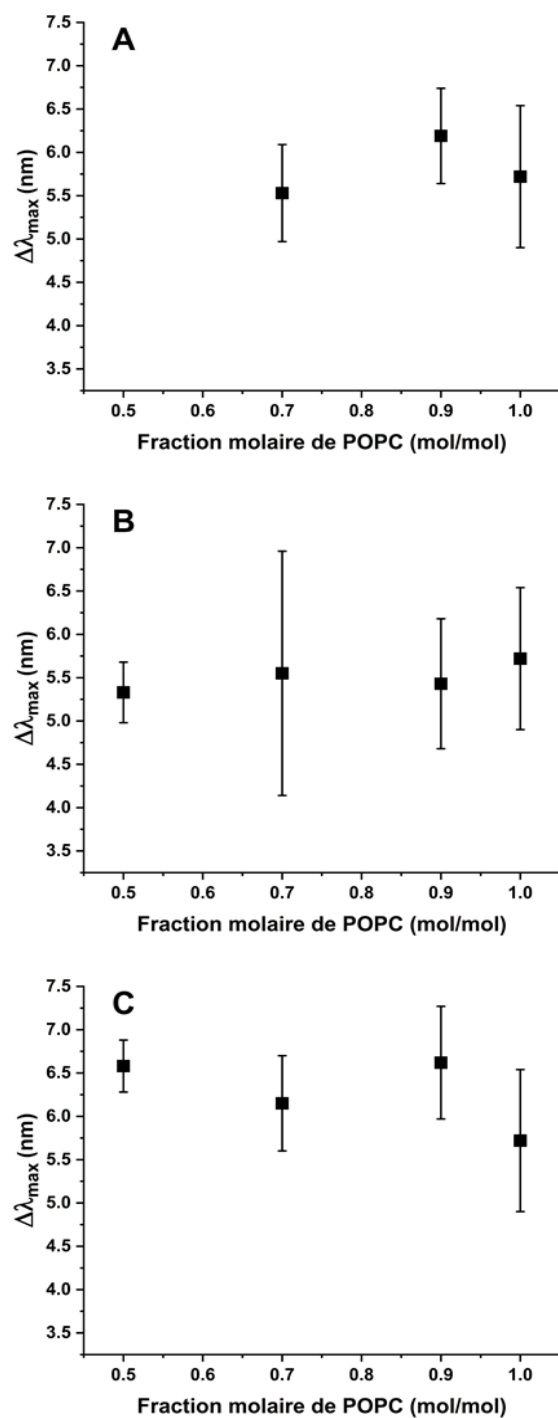




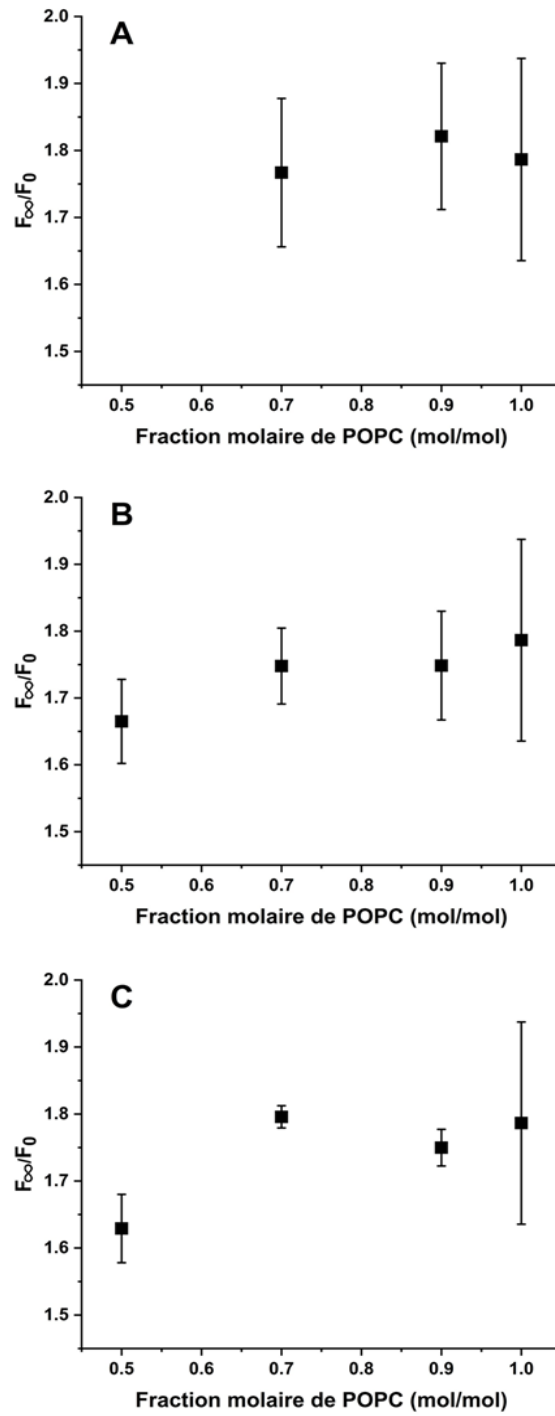
**Figure 2.2 :** Courbes de titrage obtenues par fluorescence intrinsèque de la protéine BSP1 avec des LUV de diverses compositions lipidiques : **A)** POPC (■) ; POPC/chol ( 7/3 ) (●) et POPC/chol (9/1) (▲), **B)** POPC (■) ; POPC/POPE (5/5) (●) ; POPC/POPE (7/3) (▲) ; POPC/POPE (9/1) (▼) , **C)** POPC (■) ; POPC/POPS (5/5) (●) ; (7/3) (▲) et (9/1) (▼).

Lors du titrage de la protéine BSP1, les courbes montrent une augmentation abrupte de l'intensité de fluorescence avec l'ajout de faibles concentrations de lipides pour finalement atteindre un plateau à des concentrations de lipides supérieures. L'obtention d'un plateau dans un titrage suggère que toutes les protéines sont liées avec les membranes lipidiques.

De ces courbes de titrage, nous obtenons la grandeur du décalage hypsochromique du maximum de fluorescence et la variation d'intensité de fluorescence à l'infini ( $F_{\infty}/F_0$ ). Ces valeurs sont rapportées pour les différentes compositions lipidiques aux **Figures 2.3 et 2.4**. Le déplacement hypsochromique ( $\Delta\lambda_{\max}$ ) est déterminé directement sur les spectres tandis que les valeurs de  $F_{\infty}/F_0$  ont été obtenues de l'**Équation 1.5** (voir **Section 1.9**).



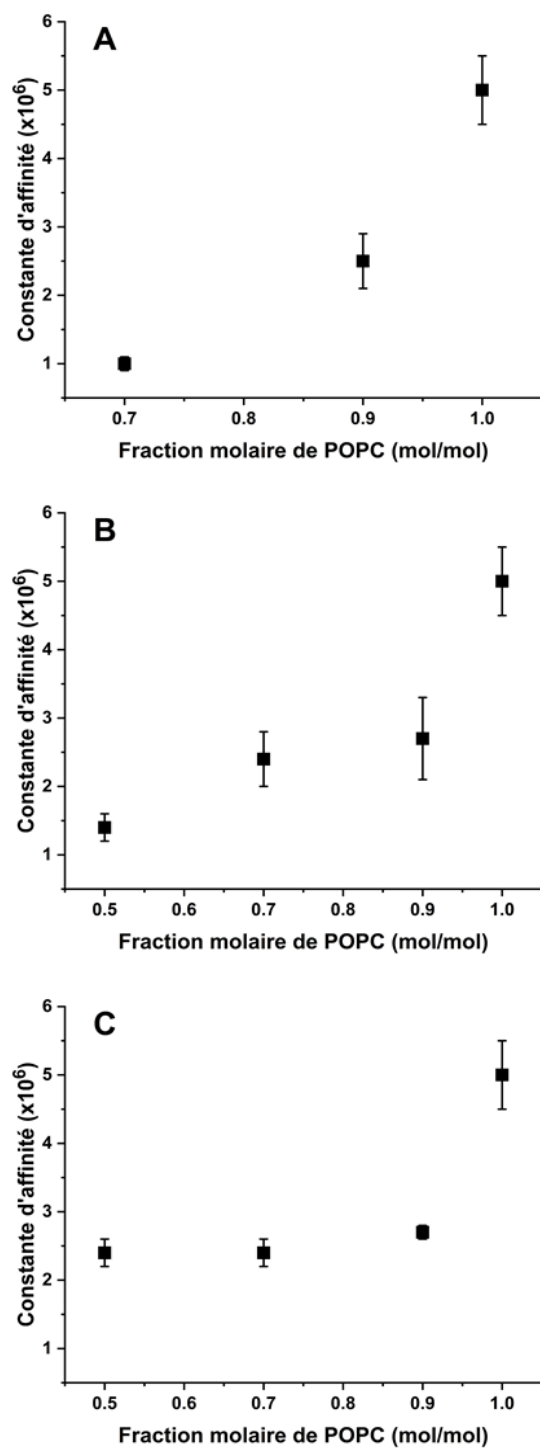
**Figure 2.3 :** Influence de la composition lipidique sur la grandeur du déplacement hypsochromique lors de la liaison de la BSP1 aux LUV.  $\Delta\lambda_{\max}$  observé pour des vésicules de POPC contenant différentes fractions molaires de : **A)** cholestérol, **B)** POPE, **C)** POPS.



**Figure 2.4 :** Influence de la composition lipidique sur le paramètre  $F_{\infty}/F_0$  pour des vésicules de POPC contenant différente fraction molaire de : **A)** cholestérol, **B)** POPE, **C)** POPS.

Ces données montrent clairement que  $\Delta\lambda_{\text{max}}$  et  $F_{\infty}/F_0$  à sont très similaires pour les différents systèmes lipidiques.

La variation de la constante d'affinité en fonction de la fraction molaire de POPC présente dans les membranes modèles pour les mélanges avec cholestérol, POPE et POPS est représentée à la **Figure 2.5**.



**Figure 2.5 :** Variation de la constante d'affinité en fonction de la fraction molaire en POPC dans les vésicules contenant : **A)** cholestérol, **B)** POPE, **C)** POPS.

Au début, on observe pour les vésicules POPC pure une constante d'affinité supérieure de  $5.0 \times 10^6$ . La comparaison de systèmes lipidiques binaires révèle que la présence de cholestérol, POPE ou de POPS diminue l'affinité de la protéine pour la bicouche. Premièrement, l'insertion du 30 % du cholestérol dans les membranes POPC provoque la diminution la plus prononcée de la constante d'affinité comme illustré à la **Figure 2.5A**; celle-ci est diminuée à  $1.5 \times 10^6$ . Deuxièmement, la présence de 50 % de POPE dans les membranes POPC a diminué la constante d'affinité à  $1.4 \times 10^6$  (**Figure 2.5B**). Finalement, l'addition de 50 % de POPS dans les membranes POPC a conduit à la diminution de la constante d'affinité à  $2.4 \times 10^6$  (**Figure 2.5C**).

## 2.4 Discussion

La fluorescence intrinsèque de la protéine BSP1 a été utilisée pour caractériser l'association de la protéine BSP1 avec les membranes modèles. Les déplacements hypsochromiques du maximum d'émission et l'augmentation de l'intensité, comme illustré dans la **Figure 2.1**, sont des indications que les résidus aromatiques de la BSP1 passent de l'environnement aqueux vers la partie apolaire des membranes lipidiques et donc sont indicatifs de l'existence des interactions entre les protéines BSP1 et les membranes (Gasset et al. 2000). Avec l'ajout de concentrations croissantes de LUV, le maximum de l'intensité d'émission de BSP1 mesuré à 337 nm pour la protéine libre est déplacé progressivement vers des longueurs d'onde plus basses, à environ 331 nm. Ces résultats sont en accord à la littérature. Par exemple, Muller et ses collaborateurs ont également obtenu un décalage du maximum d'émission de 337 à 331 nm et une augmentation de l'intensité de fluorescence lors du titrage de la BSP1 par les SUV de PC (Müller et al. 1998). Une observation similaire a été rapportée par Gasset et collaborateurs lors du titrage de la protéine par les LUV de DMPC (Gasset et al. 2000).

Les résultats présentés aux **Figures 2.3** et **2.4** montrent que les  $\Delta\lambda_{\max}$  et  $F_{\infty}/F_0$  sont similaires pour les différents systèmes lipidiques étudiés. Ceci suggère que la protéine est insérée sensiblement de la même manière dans la bicouche, quelle que soit la composition lipidique. Muller et ses collaborateurs ont montré que le déplacement hypsochromique du maximum d'émission et l'augmentation de l'intensité sont similaires dans le cas de l'interaction de la BSP1 avec les SUV de PC, PC/PE, PC/PS, et lyso-PC (Müller et al. 1998). Un effet similaire a été trouvé lors de l'étude de l'interaction de la BSP1 avec des bicouches de DMPC, de 1,2-dioleoyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine (DOPC) et de phosphatidylcholine extraite de cerveaux bovine (bbPC) (Gasset et al. 2000). Le changement d'environnement des résidus de tryptophanes vers un environnement moins polaire est semblable pour tous les systèmes lipidiques, indiquant que la position de la BSP1 liée à une bicouche est indépendante de la composition lipidique.

Les données des titrages sont simulées avec succès par le modèle de partage proposé par Ladokhin et collaborateurs (Ladokhin et al. 2000). L'analyse des données par ce modèle a permis de déterminer les constantes d'affinité. Les constantes d'affinité diminuent dans l'ordre suivant : POPC > POPC/POPE  $\approx$  POPC/POPS > POPC/chol. Ces résultats montrent que la composition en lipides influence significativement l'affinité de la protéine pour les membranes. L'interaction et l'insertion de la protéine BSP1 est favorisée en présence de POPC; la substitution de POPC par une autre espèce lipidique (POPE, POPS ou chol) mène à une diminution de l'affinité. Les mesures d'affinité de la BSP1 aux bicouches lipidiques par d'autres techniques montrent toutes une plus grande affinité pour les membranes formées exclusivement de PC; ceci inclut les études par spectroscopie de fluorescence (Gasset et al. 2000), par RPE (Ramakrishnan et al. 2001), et par SPR (Thomas et al. 2003). Il a été déjà montré que les



phospholipides possédant un groupement choline sont des sites de liaison de la BSP1 (Desnoyers et Manjunath 1992); ceux-ci (la phosphatidylcholine, la phosphatidylcholine plasmaticque, et la sphingomyéline) constituent plus de 60% des phospholipides de la membrane spermatique (Desnoyers et Manjunath 1992, Manjunath et al. 1994). Des études en cristallographie rayons X ont indiqué que la base de l'interaction spécifique entre la BSP1 et la phosphatidylcholine est la liaison des groupes phosphocholines aux deux domaines de la fibronectine II. Il est donc établi qu'il y a une interaction spécifique entre les PC et la BSP1. Cependant, pour les systèmes étudiés dans le mémoire, la constante d'affinité calculée n'est pas constante si on considère exclusivement la POPC dans les membranes, i.e. si on recalcule une constante en remplaçant la concentration de lipide par la concentration de POPC. De manière systématique, les constantes diminuent lors de l'addition d'autres lipides. Ce résultat suggère que ces lipides influencent les propriétés de la membrane d'une manière qui réduit l'association de la protéine aux membranes.

L'association de la BSP1 avec les membranes de POPC est défavorisée par la présence de POPE. Cette affinité réduite est en accord à la littérature. Par exemple, des travaux en RPE montrent que l'interaction de la protéine avec les membranes modèles diminue en présence de phosphatidyléthanolamine (Ramakrishnan et al. 2001). Thomas et ses collaborateurs ont également observé par des études en SPR que la protéine a beaucoup plus affinité pour une monocouche de DMPC/chol que pour celle de 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycéro-3-phosphoéthanolamine (DPPE)/chol (Thomas et al. 2003). Comme mentionné plus haut, une part de cette diminution peut être associée au remplacement de POPC par POPE, entraînant moins d'interactions spécifiques choline – BSP1. Cependant, on a observé que la constante d'affinité diminue même quand on tient compte de cette diminution de la quantité de POPC, suggérant

qu'une autre contribution affecte sa valeur. Les déplacements hypsochromiques observés dans les spectres d'émissions de la protéine reflète l'insertion de la protéine dans la partie hydrophobe des membranes. De plus, une étude en RPE a montré que la protéine BSP1 diminue la mobilité des chaînes acyles des lipides jusqu'au carbone 14, suggérant aussi une pénétration de la protéine dans la région hydrophobe de la bicouche (Ramakrishnan et al. 2001). Ces résultats suggèrent qu'une partie de l'affinité de la protéine pour la bicouche repose sur des interactions hydrophobes. La protéine BSP1 contient d'ailleurs des segments hydrophobes (Seidah et al. 1987). La POPE est connue pour former des membranes avec un empilement phospholipidique plus compact, associé au petit volume de sa tête polaire et à sa capacité à former des fortes interactions intermoléculaires (Lafleur et al. 1990). Ces changements dans les propriétés des bicouches peuvent défavoriser l'insertion de la protéine dans la partie hydrophobe des membranes et ainsi diminuer globalement l'affinité de la protéine.

Nos résultats montrent aussi que la présence de POPS, un lipide négatif, dans les membranes de POPC diminue l'affinité de la protéine pour les membranes lipidiques. Ramakrishnan et ses collaborateurs ont aussi observé, par RPE dans ce cas, que l'insertion de PS dans les membranes défavorise l'association de la protéine avec les membranes (Ramakrishnan et al. 2001). Dans le même sens, une étude en SPR a également suggéré que l'affinité de la BSP1 est diminuée lorsque le 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycéro-3-[phospho-rac-(1 - glycérol)] (DMPG), un phospholipide chargé négativement, est inséré dans les membranes de DMPC (Thomas et al. 2003). La protéine BSP1 possède un pI compris entre 3.6 et 5.2 (Manjunath et Thérien 2002). Les résidus chargés négativement, dont 10 acides aspartiques et 7 acides glutamiques, représentent environ 16% du total des acides aminés (Esch et al. 1983). De plus, la majorité des charges négatives sont localisées au niveau des 23 derniers résidus de

l'extrémité N-terminale: ce segment contient 4 résidus d'acide aspartique et 6 résidus d'acide glutamique. Cette structure implique la formation d'un segment avec une charge fortement négative (Esch et al. 1983). Il est alors proposé que la répulsion électrostatique entre les POPS, chargés négativement, et la BSP1 contribue à réduire significativement l'insertion de celle-ci dans les membranes.

Nos expériences ont aussi permis de déterminer que l'affinité de la protéine pour les membranes de POPC est grandement diminuée par la présence du cholestérol. Comme mentionné à la **Section 1.6**, les travaux de la littérature mènent à des conclusions différentes sur l'effet du cholestérol sur l'association de la BSP1 aux membranes, certains indiquant une augmentation de l'affinité de la protéine BSP1 pour les membranes (Swamy et al. 2002), d'autres, une diminution (Ramakrishnan et al. 2001, Lassiseraie et al. 2008), puis d'autres rapportent aucune interaction directe entre la protéine BSP1 et le cholestérol inséré dans les membranes (Desnoyers et Manjunath 1992, Moreau et Manjunath 1999, Müller et al. 2002). Nos résultats viennent consolider le concept que le cholestérol diminue l'affinité de la BSP1 pour les membranes. Le cholestérol est connu pour rendre plus compact l'empilement des phospholipides dans les membranes fluides (Douliez et al. 1996, Li et al. 2001), un effet également obtenu sur les membranes de spermatozoïdes (Wah et al. 2002). Ce phénomène devrait contribuer à rendre plus difficile l'insertion de la protéine dans les membranes, ce qui contribuerait à diminuer l'affinité de la BSP1 pour la bicouche. Une association plus limitée dans des membranes contenant du cholestérol est souvent observée pour des peptides qui pénètrent à l'intérieur de la partie hydrophobe des membranes. Par exemple, l'affinité des peptides nisine et mélittine pour les membranes de phosphatidylcholine est réduite lorsque le cholestérol y est inséré (Benachir et al. 1997, El Jastimi et al. 1999). Il est intéressant de noter

que dans les membranes des spermatozoïdes il y a d'environ 45 molécules de cholestérol pour 100 molécules de lipides (Davis 1981, Nolan et Hammerstedt 1997). Donc, l'impact important du cholestérol sur la liaison de la protéine avec les membranes peut avoir des conséquences biologiques cruciales.

Ce chapitre propose que la protéine BSP1 s'associe aux membranes lipidiques de différentes compositions. Il est montré que la protéine BSP1 interagit de manière spécifique avec les phospholipides de type choline. Les résultats présentés indiquent que la composition lipidique influence significativement l'affinité de la protéine BSP1 pour les membranes. La présence de cholestérol, de POPE ou de POPS dans les membranes de POPC diminue considérablement l'affinité de la protéine, le cholestérol montrant la diminution la plus prononcée. Il est proposé qu'une combinaison de facteurs conduit à la diminution de l'affinité. Premièrement, la diminution de la densité de groupements choline à l'interface, par la proportion réduite de POPC, offre moins de sites pour une interaction directe avec les groupements fibronectine de la protéine. Deuxièmement, d'autres interactions semblent entrer en jeu. La diminution de l'affinité induite par la présence de cholestérol et de POPE est associée à la compacité de la chaîne lipidique qui défavorise les interactions hydrophobes, tandis que la diminution induite par les POPS pourrait être associée aux les interactions électrostatiques répulsives.

# Chapitre 3 : Étude par diffusion dynamique de la lumière de la solubilisation membranaire et reconstitution par Triton X-100

## 3.1 Introduction

Dans ce chapitre, la solubilisation et la reconstitution des membranes modèles par le TX-100 ont été investiguées à l'aide de la technique de la DLS pour déterminer comment la composition lipidique influence ces deux processus. Cette étude constitue une étape préliminaire à celle de la solubilisation membranaire de la BSP1, caractérisée par DLS.

## 3.2 Matériel et méthodes

### 3.2.1 Matériel

Les lipides utilisés, soient la POPC, la POPE et le POPG ont été obtenus d'*Avanti Polar Lipids* (Birmingham, AL, USA). Le Triton X-100 a été acheté chez *Acros*. Le tris(hydroxyméthyl) aminoéthane (Tris) a été obtenu chez *Sigma* (St-Louis, MO). Les autres produits chimiques ont été obtenus tel que décrit à la **Section 2.2**.

### 3.2.2 Préparation des solutions

La préparation des différents mélanges lipidiques, des LUV et la quantification des phospholipides sont décrites à la **Section 2.2**. Pour les travaux de ce chapitre, les solutions et suspensions sont préparées dans le tampon Tris (10 mM de Tris, 10 mM de NaCl, pH 7.4).

### 3.3.3 Titrage par DLS et évaluation des données

Les processus de solubilisation et reconstitution ont été caractérisés en utilisant un appareil *Zetasizer Nano* (*Malvern Instruments, Worcestershire, UK*), couplé à un autocorrélateur (*Malvern Instruments, Worcestershire, UK*), avec un laser de He-Ne ( $\lambda_0 = 632.8$  nm) comme source de rayonnement. Avant les mesures, tous les échantillons ont été filtrés avec un filtre de porosité de  $0.45\ \mu\text{m}$  afin d'éliminer les particules. Les titrages ont été réalisés en ajoutant une solution du TX-100 aux LUV pour le processus de la solubilisation, ou l'inverse, en ajoutant des fractions aliquotes de suspension de LUV lipidiques à une solution du TX-100 pour le processus de la reconstitution. Les échantillons ont été agités pendant 10 minutes, puis placés dans des cuvettes en polyméthacrylate de méthyle (PMMA) fermées, pour éviter l'évaporation de l'eau. La lumière diffusée a été recueillie à un angle de  $173^\circ$  par rapport au rayonnement incident. Les fonctions de corrélation ont été analysées à partir de la méthode des cumulants, dans le programme *CONTIN*. Lorsqu'il y a deux populations, les proportions sont données en termes de l'intensité de lumière diffusée. Les mesures ont été faites à une température de  $28.0 \pm 0.1\ ^\circ\text{C}$ . Le temps d'acquisition était de 3 minutes; chaque valeur correspond à une moyenne de 3 valeurs, chacune d'elles issue d'une moyenne de 11 mesures. De plus, les mesures ont été faites en triplicata et les résultats présentés sont exprimés sous forme de moyennes arithmétiques, accompagnées de l'écart type (moyenne  $\pm$  écart-type).

## 3.3 Résultats

### 3.3.1 Interaction entre les LUV de POPC et TX-100

#### 3.3.1.1 Titrage des LUV de POPC par TX-100 (solubilisation)

Le titrage des vésicules de POPC par le TX-100 a été caractérisé par la méthode de diffusion dynamique de la lumière; les diamètres obtenus sont présentés au **Tableau 3.1**. La première valeur correspond au Triton seul, à 5 mM, soit au-dessus de sa CMC (CMC= 0.23 mM (Lasch 1995, Heerklotz et Seelig 2000)). Le diamètre des vésicules de POPC était de  $134 \pm 3$  nm, une valeur attendue considérant l'extrusion avec des filtres dont les pores faisaient 100 nm. Le diamètre des micelles de TX-100 était de 9.88 nm, une valeur très proche de celle trouvée par (López et al. 1998). La solubilisation des vésicules de POPC par le détergent se fait en trois étapes (**Figure 3.1**). Premièrement, l'ajout de TX-100 jusqu'à une concentration de 1.85 mM induit une légère augmentation de la taille des vésicules. Ce résultat suggère que le TX-100 ajouté était progressivement incorporé dans la membrane, menant à l'obtention de vésicules mixtes de POPC/TX-100. Deuxièmement, des concentrations de TX-100 entre 2.22 à 2.50 mM entraînaient la solubilisation partielle des bicouches. Deux tailles différentes étaient alors mesurées; on retrouvait des particules d'un diamètre allant jusqu'à  $310 \pm 70$  nm, associées à des vésicules mixtes de POPC/TX-100, et des particules plus petites d'environ 20 nm, associées à des micelles mixtes de POPC/TX-100. Troisièmement, à une concentration de TX-100 supérieure à 2.5 mM, des particules de  $21.4 \pm 0.4$  à  $10 \pm 1$  nm sont présentes dans la solution. Ceci suggère une solubilisation complète des vésicules de POPC et la formation des micelles mixtes de POPC/TX-100.

**Tableau 3.1** : Variation de distribution de taille pour le titrage des LUV de POPC par le TX-100. Les zones rouges, grises, et bleues représentent respectivement, les bicouches, la coexistence des micelles et des bicouches, et les micelles.

Échantillon	[POPC] (mM)	[TX-100] (mM)	Description des particules détectées			
			1 <sup>er</sup> pic		2 <sup>ème</sup> pic	
			Diamètre (nm)	Proportion (%) <sup>b</sup>	Diamètre (nm)	Proportion (%) <sup>b</sup>
TX-100 <sup>a</sup>	–	5.00	9.88 ± 0.03	100.00	–	–
POPC <sup>a</sup>	2.42	–	134 ± 3	100.00	–	–
1 <sup>a</sup>	2.24	0.37	136 ± 3	100.00	–	–
2 <sup>a</sup>	2.06	0.74	139 ± 2	100.00	–	–
3 <sup>a</sup>	1.88	1.11	159 ± 1	100.00	–	–
4 <sup>a</sup>	1.70	1.48	181 ± 4	100.00	–	–
5 <sup>a</sup>	1.52	1.85	205 ± 2	100.00	–	–
6	1.34	2.22	250 ± 10	78 ± 1	19 ± 1	22 ± 1
7	1.21	2.50	25 ± 1	77 ± 1	310 ± 70	23 ± 1
8 <sup>a</sup>	1.06	2.80	21.4 ± 0.4	100.00	–	–
9 <sup>a</sup>	0.91	3.12	17.8 ± 0.3	100.00	–	–
10 <sup>a</sup>	0.76	3.44	14.4 ± 0.2	100.00	–	–
11 <sup>a</sup>	0.60	3.77	12 ± 1	100.00	–	–
12 <sup>a</sup>	0.43	4.11	11.4 ± 0.4	100.00	–	–
13 <sup>a</sup>	0.33	4.31	10.6 ± 0.2	100.00	–	–
14 <sup>a</sup>	0.26	4.46	10.4 ± 0.2	100.00	–	–
15 <sup>a</sup>	0.23	4.53	10 ± 1	100.00	–	–

(a) Signifie que l'indice de polydispersité est inférieur à 0.3.

(b) Proportion de l'intensité.

### 3.3.1.2 Titrage du TX-100 par des LUV de POPC (reconstitution)

Le **Tableau 3.2** montre les diamètres obtenus pour le titrage du TX-100 par des vésicules de POPC. Trois phénomènes différents sont observés pour ce titrage (**Tableau 3.2** et **Figure 3.1**).



**Tableau 3.2 :** Variation de distribution de taille pour le titrage du TX-100 par des LUV de POPC. Les zones bleues, grises, et rouges présentent, respectivement, les micelles, la coexistence des micelles et des bicouches, et les bicouches.

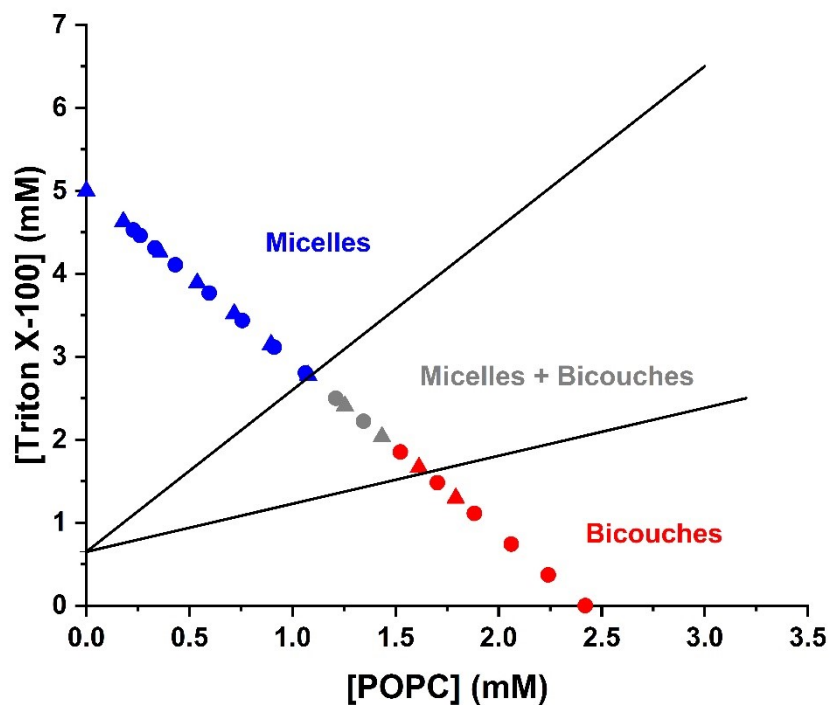
Échantillon	[POPC] (mM)	[TX-100] (mM)	Description des particules détectées			
			1 <sup>er</sup> pic		2 <sup>ème</sup> pic	
			Diamètre (nm)	Proportion (%) <sup>b</sup>	Diamètre (nm)	Proportion (%) <sup>b</sup>
POPC <sup>a</sup>	2.42	–	133 ± 1	100	–	–
TX-100 <sup>a</sup>	–	5.00	9.71 ± 0.05	100	–	–
1 <sup>a</sup>	0.18	4.63	9.5 ± 0.2	100	–	–
2 <sup>a</sup>	0.36	4.26	10.1 ± 0.2	100	–	–
3 <sup>a</sup>	0.54	3.89	11.8 ± 0.2	100	–	–
4 <sup>a</sup>	0.72	3.52	14.1 ± 0.4	100	–	–
5 <sup>a</sup>	0.90	3.15	17.5 ± 0.4	100	–	–
6 <sup>a</sup>	1.08	2.78	23 ± 1	100	–	–
7	1.25	2.41	400 ± 10	74 ± 1	22.4 ± 0.3	25 ± 1
8	1.43	2.04	279 ± 5	92 ± 1	18 ± 2	7 ± 1
9 <sup>a</sup>	1.61	1.67	222 ± 2	100	–	–
10 <sup>a</sup>	1.79	1.30	183 ± 5	100	–	–

(a) Signifie que l'indice de polydispersité est inférieur à 0.3.

(b) Proportion de l'intensité.

Le diamètre initial des micelles TX-100 en l'absence de POPC était de 9.71 nm. Lors de l'ajout de vésicules de POPC, le diamètre des micelles a augmenté progressivement jusqu'à des concentrations de 1.08 mM de POPC. Cette augmentation de diamètre suggère la formation des micelles mixtes de TX-100/POPC. Des concentrations entre 1.25 et 1.43 mM de POPC entraînaient la formation de deux populations différentes. La population de particules d'un diamètre entre 400 ± 10 à 279 ± 5 nm est proposée correspondre à des vésicules mixtes de POPC/TX-100, tandis que la population d'un diamètre entre 22.4 ± 0.3 à 18 ± 2 nm est proposée être liée aux micelles mixtes de POPC/TX-100. À des concentrations supérieures à 1.43 mM de

POPC, seules des particules d'environ 200 nm de diamètre, cohérentes avec des vésicules de POPC contenant du TX-100, étaient observées.



**Figure 3.1** : Changement de la morphologie des particules pendant le titrage des LUV de POPC par le TX-100 (cercle), et pour le titrage du TX-100 par des LUV de POPC (triangle). Les symboles rouges, gris, et bleus représentent, respectivement, les conditions pour lesquelles les résultats de DLS montrent des résultats compatibles avec des LUV mixtes de POPC/TX-100, des LUV et des micelles mixtes de POPC/TX-100, et des micelles mixtes de POPC/TX-100. Les lignes continues représentent le diagramme de phase de POPC/TX-100 déterminé par ITC par M. Azouz (Azouz 2020).

### 3.3.2 Interaction entre les LUV de POPC/POPE et TX-100

#### 3.3.2.1 Titrage des LUV de POPC/POPE par TX-100 (solubilisation)

Le **Tableau 3.3** montre les tailles obtenues lors de la solubilisation des vésicules faites d'un mélange de POPC/POPG 60/40 (mol/mol) par des concentrations croissantes du TX-100. La même tendance dans les changements de taille des vésicules que ceux observés lors titrage des vésicules de POPC par le TX-100 a été observée.

**Tableau 3.3** : Variation de distribution de taille pour le titrage des LUV de POPC/POPE 60/40 (mol/mol) par le TX-100. Les zones rouges, grises, et bleues représentent respectivement, les bicouches, la coexistence des micelles et des bicouches, et les micelles.

Échantillon	[POPC/POPE] (mM)	[TX-100] (mM)	Description des particules détectées			
			1 <sup>er</sup> pic		2 <sup>ème</sup> pic	
			Diamètre (nm)	Proportion (%) <sup>b</sup>	Diamètre (nm)	Proportion (%) <sup>b</sup>
TX-100 <sup>a</sup>	–	8.00	10.4 ± 0.1	100	–	–
POPC/POPE <sup>a</sup>	1.89	–	143 ± 3	100	–	–
1 <sup>a</sup>	1.80	0.38	145 ± 5	100	–	–
2 <sup>a</sup>	1.71	0.75	148 ± 1	100	–	–
3 <sup>a</sup>	1.62	1.12	150 ± 4	100	–	–
4 <sup>a</sup>	1.54	1.50	151 ± 3	100	–	–
5 <sup>a</sup>	1.45	1.86	153 ± 3	100	–	–
6 <sup>a</sup>	1.35	2.30	156 ± 3	100	–	–
7	1.23	2.79	166 ± 5	83 ± 1	14.6 ± 0.4	17 ± 1
8 <sup>a</sup>	1.11	3.30	15 ± 1	100	–	–
9 <sup>a</sup>	0.99	3.80	16.2 ± 0.3	100	–	–
10 <sup>a</sup>	0.88	4.26	13 ± 1	100	–	–
11 <sup>a</sup>	0.79	4.67	12 ± 1	100	–	–
12 <sup>a</sup>	0.70	5.04	11.7 ± 0.2	100	–	–
13 <sup>a</sup>	0.62	5.37	11.4 ± 0.2	100	–	–
14 <sup>a</sup>	0.55	5.67	11.1 ± 0.2	100	–	–
15 <sup>a</sup>	0.48	5.95	11.3 ± 0.4	100	–	–

(a) Signifie que l'indice de polydispersité est inférieur à 0.3.

(b) Proportion de l'intensité.

Le diamètre initial des LUV de POPC/POPE et des micelles de TX-100 sont  $143 \pm 3$  nm et  $10.4 \pm 0.1$  nm, respectivement. La solubilisation des vésicules de POPC/POPE présentent trois régions distinctes (**Tableau 3.3** et **Figure 3.2**). Premièrement, à des concentrations de TX-100 inférieures à 2.79 mM on observait une augmentation de la taille des LUV de POPC/POPE jusqu'à un diamètre de 156 nm. Cette augmentation est probablement due à l'insertion de monomères de TX-100 dans les bicouches POPC/POPE pour donner des vésicules mixtes de phospholipides/détergents. Deuxièmement, il existait deux populations de particules en présence de 2.79 mM du TX-100: les diamètres étaient  $166 \pm 5$  nm et  $14.6 \pm 0.4$  nm, correspondant respectivement aux vésicules mixtes de phospholipides/détergents et micelles mixtes de phospholipides/détergents. Troisièmement, à des concentrations de TX-100 supérieures à 2.79 mM, on observait l'apparition de petites particules d'un diamètre compris entre 15 à 11 nm, indiquant la formation des micelles mixtes de phospholipides/détergents.

### 3.3.2.2 Titrage du TX-100 par des LUV de POPC/POPE (reconstitution)

Le **Tableau 3.4** montre le changement du diamètre de particules pendant le titrage du TX-100 par des LUV de POPC/POPE 60/40 (mol/mol), une expérience de reconstitution. Comme lors du titrage de reconstitution de TX-100 avec POPC, trois étapes différentes sont détectées (**Tableau 3.4** et **Figure 3.2**). Le diamètre mesuré pour les LUV de POPC/POPE et les micelles de TX-100, est de  $145 \pm 2$  nm et  $10.23 \pm 0.04$  nm, respectivement. Une concentration en lipide inférieure à 1.19 mM, entraînait une augmentation de la taille des petites particules associées aux micelles mixtes de phospholipides/détergents jusqu'à une taille de  $16 \pm 1$  nm. À une concentration de 1.19 mM en lipides, des nouvelles particules avec un diamètre de  $174 \pm 1$  nm apparaissent dans la solution; elles sont associées à des vésicules mixtes phospholipides/détergents. Au-dessus de la concentration de 1.19 mM en lipides, on observait

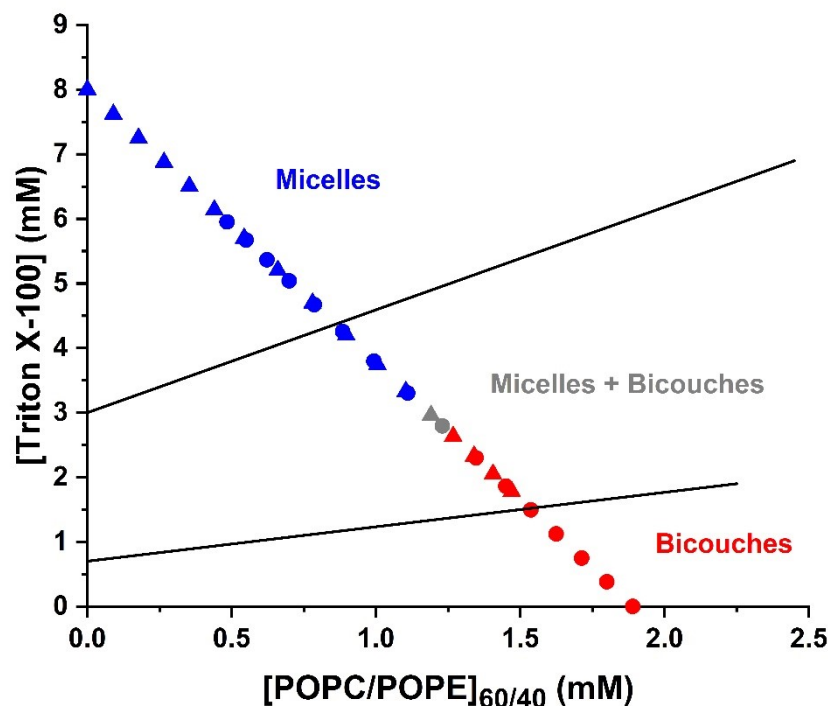
la formation exclusive des particules d'environ 160 nm de diamètre, suggérant la reconstitution complète en vésicules mixtes de phospholipides/détergents.

**Tableau 3.4 :** Variation de distribution de taille pour le titrage du TX-100 par des LUV de POPC/POPE 60/40 (mol/mol). Les zones bleues, grises, et rouges présentent, respectivement, les micelles, la coexistence des micelles et des bicouches, et les bicouches.

Échantillon	[POPC/POPE] (mM)	[TX-100] (mM)	Description des particules détectées			
			1 <sup>er</sup> pic		2 <sup>ème</sup> pic	
			Diamètre (nm)	Proportion (%) <sup>b</sup>	Diamètre (nm)	Proportion (%) <sup>b</sup>
POPC/POPE <sup>a</sup>	1.89	–	145 ± 2	100	–	–
TX-100 <sup>a</sup>	–	8.00	10.23 ± 0.04	100	–	–
1 <sup>a</sup>	0.09	7.62	10.2 ± 0.3	100	–	–
2 <sup>a</sup>	0.18	7.25	10.5 ± 0.1	100	–	–
3 <sup>a</sup>	0.27	6.88	10.4 ± 0.1	100	–	–
4 <sup>a</sup>	0.35	6.50	10.6 ± 0.3	100	–	–
5 <sup>a</sup>	0.44	6.14	10.7 ± 0.3	100	–	–
6 <sup>a</sup>	0.54	5.70	10.9 ± 0.4	100	–	–
7 <sup>a</sup>	0.66	5.21	11.9 ± 0.1	100	–	–
8 <sup>a</sup>	0.78	4.70	12.7 ± 0.4	100	–	–
9 <sup>a</sup>	0.90	4.20	13 ± 1	100	–	–
10 <sup>a</sup>	1.01	3.74	14 ± 1	100	–	–
11 <sup>a</sup>	1.10	3.33	16 ± 1	100	–	–
12	1.19	2.96	174 ± 1	88 ± 1	15 ± 1	12 ± 1
13 <sup>a</sup>	1.27	2.63	165 ± 3	100	–	–
14 <sup>a</sup>	1.34	2.33	160 ± 3	100	–	–
15 <sup>a</sup>	1.41	2.05	159 ± 2	100	–	–
16 <sup>a</sup>	1.47	1.78	154 ± 2	100	–	–

(a) Signifie que l'indice de polydispersité est inférieur à 0.3.

(b) Proportion de l'intensité.



**Figure 3.2 :** Changement de la morphologie des particules pendant le titrage des LUV de POPC/POPE 60/40 (mol/mol) par le TX-100 (cercle), et pour le titrage du TX-100 par des LUV de POPC/POPE 60/40 (mol/mol) (triangle). Les symboles rouges, gris, et bleus représentent, respectivement, les conditions pour lesquelles les résultats de DLS montrent des résultats compatibles avec des LUV mixtes de POPC/POPE/TX-100, des LUV et des micelles mixtes de POPC/POPE/TX-100, et des micelles mixtes de POPC/POPE/TX-100. Les lignes continues représentent le diagramme de phase de POPC/POPE/TX-100 déterminé par ITC par M. Azouz (Azouz 2020).

### 3.3.3 Interaction entre les LUV de POPC/POPG et TX-100

#### 3.3.3.1 Titrage des LUV de POPC/POPG par TX-100 (solubilisation)

La solubilisation des vésicules contenant du POPG, un phospholipide chargé négativement, par le TX-100 a également été étudiée. La composition de ces membranes était POPC/POPG 60/40 (mol/mol). Les étapes de la solubilisation obtenues dans ce cas sont très

similaires à ceux obtenues pour les membranes de POPC et POPC/POPE. La variation de la taille de particules pour le titrage des LUV de POPC/POPG par le TX-100 est présentée au **Tableau 3.5** et à la **Figure 3.3**.

**Tableau 3.5 :** Variation de distribution de taille pour le titrage des LUV de POPC/POPG 60/40 (mol/mol) par le TX-100. Les zones rouges, grises, et bleues représentent respectivement, les bicouches, la coexistence micelles et bicouches, et les micelles.

Échantillon	[POPC/POPG] (mM)	[TX-100] (mM)	Description des particules détectées			
			1 <sup>er</sup> pic		2 <sup>ème</sup> pic	
			Diamètre (nm)	Proportion (%) <sup>b</sup>	Diamètre (nm)	Proportion (%) <sup>b</sup>
TX-100 <sup>a</sup>	–	8.00	10.1 ± 0.3	100	–	–
POPC/POPG <sup>a</sup>	2.34	–	120 ± 4	100	–	–
1 <sup>a</sup>	2.26	0.26	121 ± 3	100	–	–
2 <sup>a</sup>	2.18	0.55	123 ± 1	100	–	–
3 <sup>a</sup>	2.09	0.86	124 ± 3	100	–	–
4 <sup>a</sup>	1.99	1.18	142 ± 3	100	–	–
5 <sup>a</sup>	1.90	1.51	145 ± 2	100	–	–
6 <sup>a</sup>	1.80	1.85	154 ± 6	100	–	–
7	1.70	2.17	184 ± 6	89 ± 1	29 ± 3	11 ± 1
8	1.61	2.50	220 ± 30	55 ± 2	37 ± 2	45 ± 2
9 <sup>a</sup>	1.52	2.81	40 ± 3	100	–	–
10 <sup>a</sup>	1.43	3.10	31.9 ± 0.3	100	–	–
11 <sup>a</sup>	1.35	3.38	25 ± 1	100	–	–
12 <sup>a</sup>	1.27	3.65	22 ± 1	100	–	–
13 <sup>a</sup>	1.20	3.90	20 ± 1	100	–	–
14 <sup>a</sup>	1.13	4.14	18.1 ± 0.4	100	–	–
15 <sup>a</sup>	1.06	4.36	17 ± 1	100	–	–

(a) Signifie que l'indice de polydispersité est inférieur à 0.3.

(b) Proportion de l'intensité.

Les LUV de POPC/POPG ne montraient qu'un seul type des particules avec un diamètre de 120 ± 4 nm. Jusqu'à une concentration de 1.85 mM, l'addition de TX-100 aux LUV de POPC/POPG a entraîné une augmentation de la taille des LUV jusqu'à un diamètre de 154 ± 6

nm. Cette augmentation est probablement due à l'incorporation du TX-100 dans les LUV pour former des vésicules mixtes de phospholipides/détergents. À des concentrations entre 2.17 et 2.50 mM en TX-100, deux populations de particules ont été identifiées : leurs diamètres étaient de  $184 \pm 6$  à  $220 \pm 30$  nm et de  $29 \pm 3$  à  $37 \pm 2$  nm. Les résultats suggèrent la coexistence de vésicules mixtes de phospholipides/détergents (les grosses particules) et de micelles mixtes (les petites particules). À des concentrations supérieures à 2.50 mM en TX-100, seules des particules d'environ 40 à 20 nm de diamètre étaient observées. Ceci suggère la solubilisation totale des LUV induisant à la formation des micelles mixtes de phospholipides/détergents.

### **3.3.3.2 Titrage du TX-100 par des LUV de POPC/POPG (reconstitution)**

Le titrage de reconstitution avec le TX-100 a aussi été effectué pour caractériser l'effet de la présence du POPG dans les membranes de POPC. Comme pour les autres titrages, trois régions ont été observées pendant le titrage (**Tableau 3.6** et **Figure 3.3**).

À une concentration inférieure à 1.56 mM en lipides, on a observé une augmentation du diamètre des micelles de TX-100 jusqu'à une taille de  $39 \pm 2$  nm; ce résultat suggère l'obtention des micelles mixtes de phospholipides/détergents. Des concentrations entre 1.56 et 1.65 mM en lipides, ont induit la formation d'un mélange de petites et de grosses particules. Les grosses particules avec un diamètre entre  $269 \pm 8$  et  $195 \pm 2$  nm devraient correspondre à des LUV mixtes de phospholipides/détergents, tandis que les petites, d'un diamètre d'environ 30 nm, aux micelles mixtes de phospholipides/détergents. À des concentrations supérieures à 1.65 mM, seules des particules d'environ 150 nm de diamètre étaient présentés dans le mélange, suggérant la reconstitution complète des LUV de phospholipides/détergents.

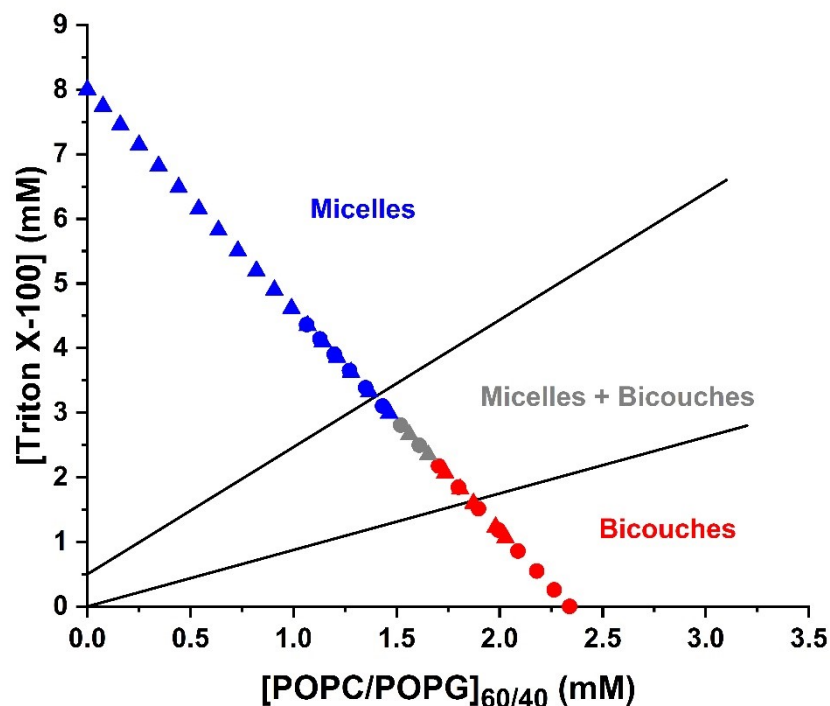


**Tableau 3.6 :** Variation de distribution de taille pour le titrage du TX-100 par des LUV de POPC/POPG 60/40 (mol/mol). Les zones bleues, grises, et rouges présentent, respectivement, les micelles, la coexistence des micelles et des bicouches, et les bicouches.

Échantillon	[POPC/POG] (mM)	[TX-100] (mM)	Description des particules détectées			
			1 <sup>er</sup> pic		2 <sup>ème</sup> pic	
			Diamètre (nm)	Proportion (%) <sup>b</sup>	Diamètre (nm)	Proportion (%) <sup>b</sup>
POPC/POPG <sup>a</sup>	2.34	–	122 ± 5	100	–	–
TX-100 <sup>a</sup>	–	8.00	10.2 ± 0.1	100	–	–
1 <sup>a</sup>	0.08	7.74	11 ± 1	100	–	–
2 <sup>a</sup>	0.16	7.45	10.6 ± 0.2	100	–	–
3 <sup>a</sup>	0.25	7.14	10.9 ± 0.1	100	–	–
4 <sup>a</sup>	0.35	6.82	11.1 ± 0.3	100	–	–
5 <sup>a</sup>	0.44	6.49	10.4 ± 0.2	100	–	–
6 <sup>a</sup>	0.54	6.15	10.9 ± 0.2	100	–	–
7 <sup>a</sup>	0.64	5.83	11.5 ± 0.2	100	–	–
8 <sup>a</sup>	0.73	5.50	11.9 ± 0.3	100	–	–
9 <sup>a</sup>	0.82	5.19	13.4 ± 0.2	100	–	–
10 <sup>a</sup>	0.91	4.90	14.6 ± 0.3	100	–	–
11 <sup>a</sup>	0.99	4.62	15 ± 1	100	–	–
12 <sup>a</sup>	1.07	4.35	17 ± 2	100	–	–
13 <sup>a</sup>	1.14	4.10	20 ± 1	100	–	–
14 <sup>a</sup>	1.21	3.86	22 ± 1	100	–	–
15 <sup>a</sup>	1.28	3.63	25.9 ± 0.4	100	–	–
16 <sup>a</sup>	1.37	3.32	30.7 ± 0.4	100	–	–
17 <sup>a</sup>	1.46	2.99	39 ± 2	100	–	–
18	1.56	2.66	269 ± 8	66 ± 2	35 ± 2	34 ± 2
19	1.65	2.35	195 ± 2	90.4 ± 0.2	24 ± 1	9.6 ± 0.2
20 <sup>a</sup>	1.74	2.07	167 ± 3	100	–	–
21 <sup>a</sup>	1.81	1.82	156 ± 1	100	–	–
22 <sup>a</sup>	1.87	1.60	150 ± 1	100	–	–
23 <sup>a</sup>	1.98	1.23	143 ± 1	100	–	–
24 <sup>a</sup>	2.03	1.07	139 ± 2	100	–	–

(a) Signifie que l'indice de polydispersité est inférieur à 0.3.

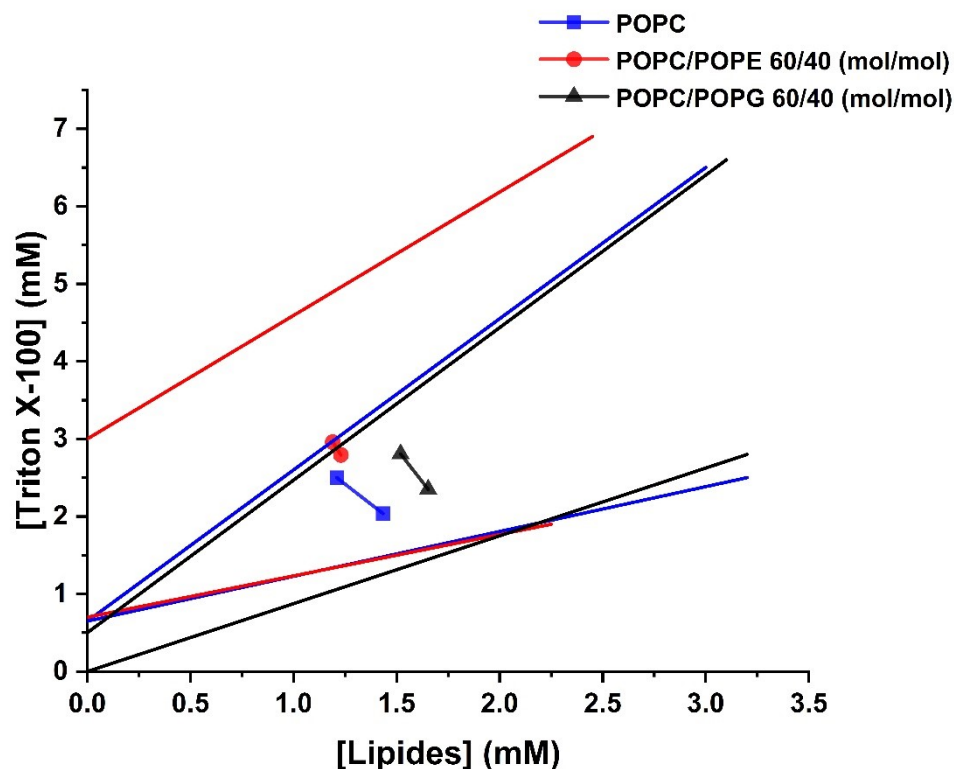
(b) Proportion de l'intensité.



**Figure 3.3 :** Changement de la morphologie des particules pendant le titrage des LUV de POPC/POPG 60/40 (mol/mol) par le TX-100 (cercle), et pour le titrage du TX-100 par des LUV de POPC/POPG 60/40 (mol/mol) (triangle). Les symboles rouges, gris, et bleus représentent, respectivement, les conditions pour lesquelles les résultats de DLS montrent des résultats compatibles avec des LUV mixtes de POPC/POPG/TX-100, des LUV et des micelles mixtes de POPC/POPG/TX-100, et des micelles mixtes de POPC/POPG/TX-100. Les lignes continues représentent le diagramme de phase de POPC/POPG/TX-100 déterminé par ITC par M. Azouz (Azouz 2020).

### 3.3.4 Effet de la composition lipidique sur le titrage de solubilisation/reconstitution

Une analyse graphique a été réalisée pour obtenir des informations sur les changements de la zone de coexistence pour les différentes compositions lipidiques. La zone de coexistence pour chaque composition lipidique est présentée à la **Figure 3.4**.



**Figure 3.4 :** Changement de la zone de coexistence pendant la solubilisation membranaire et reconstitution par Triton X-100. Les lignes délimitées par deux symboles viennent des expériences DLS du présent travail. Les lignes simples représentent les limites des diagrammes de phase pour les différents systèmes lipidiques/TX-100 déterminé par ITC par M. Azouz (Azouz 2020).

Nous observons à la **Figure 3.4** que la zone de coexistence liposome/micelle de chaque système lipidique obtenue par DLS correspond à celle déterminée à l'aide du ITC (Azouz 2020). Il est intéressant de noter que les zones de coexistence obtenues par DLS sont plus étroites que celles obtenues par ITC, une variation discutée plus loin dans ce chapitre.

Nous avons calculé les rapports molaires  $R_{\text{sat}}^{\text{bicouche}}$  (le rapport molaire détergent/lipide dans une bicouche saturée en détergent) et  $R_{\text{sat}}^{\text{micelle}}$  (le rapport molaire détergent/lipide dans une micelle saturée en lipide). Les valeurs de ces rapports sont résumées dans le **Tableau 3.7**.

**Tableau 3.7 :** Rapports molaires  $R_{\text{sat}}^{\text{bicouche}}$  et  $R_{\text{sat}}^{\text{micelle}}$  obtenus pour les différents systèmes lipidiques.

Système	$R_{\text{sat}}^{\text{bicouche}}$ (mol/mol)	$R_{\text{sat}}^{\text{micelle}}$ (mol/mol)
POPC	1.1	2.0
POPC/POPE (6/4)	1.8	2.5
POPC/POPG (6/4)	1.2	2.0

### 3.4 Discussion

Nos résultats sont interprétés à la lumière des études décrivant les processus de solubilisation et de reconstitution des membranes lipidiques à l'aide de différents détergents (Heerklotz 2008, Krylova et al. 2010, Lichtenberg et al. 2013, Mattei et al. 2014, Pizzirusso et al. 2017). Le TX-100 présente des réorganisations simples. Les titrages de solubilisation et de reconstitution montrent trois régions: i) le TX-100 se distribue dans les bicouches lipidiques, ii) une coexistence de bicouches lipidiques saturées de détergents et de micelles mixtes de TX-100/phospholipides et iii) exclusivement des micelles mixtes de TX-100/phospholipides (Levy et al. 1990, Knol et al. 1998, López et al. 2001).

Lors de la solubilisation des vésicules de POPC, l'addition de TX-100 à une concentration inférieure à 2.22 mM aux bicouches de POPC a entraîné une légère augmentation de la taille des vésicules mixtes de 134 à 205 nm (**Tableau 3.1**). Des études de DLS et de microscopie électronique avec cryofracture rapportées par López et collaborateurs montrent également que la taille des vésicules de POPC augmente en présence de TX-100 (López et al. 1998). Cette augmentation de taille est attribuée à l'insertion de TX-100 monomères à l'intérieur de la membrane, ce qui entraîne une augmentation du diamètre des vésicules de POPC.

Le rapport  $R_{\text{sat}}^{\text{bicouche}}$  obtenu avec POPC est 1.1 (**Tableau 3.7**). Cette valeur est identique à celle trouvée par Ahyayauch et collaborateurs pour la solubilisation des vésicules de POPC par le TX-100 en suivant les changements de turbidité (Ahyayauch et al. 2006). López et ses collaborateurs ont également montré par la DLS que les vésicules de POPC étaient capables d'incorporer du TX-100 jusqu'à un rapport  $R_{\text{sat}}^{\text{bicouche}}$  de 0.8 (nous avons calculé ce rapport en soustrayant de la concentration totale de détergent à l'apparition des micelles la CMC du TX-100) (López et al. 1998). Des études en ITC reportées par Heerklotz et collaborateurs montrent un rapport  $R_{\text{sat}}^{\text{bicouche}}$  de 0.4 pour des vésicules de POPC; cependant ces mesures ont été effectuées à 37 °C (Heerklotz 2002). La différence de température ne peut cependant pas expliquer cette valeur un peu plus faible car dans cette étude, les auteurs ont examiné la variation de  $R_{\text{sat}}^{\text{bicouche}}$  en fonction de la température et, sur l'intervalle entre 37 et 50 °C, le rapport diminue lorsque la température diminue. L'origine de cette faible valeur est pour le moment inconnue.

Dans la zone de coexistence, les tailles mesurées par DLS étaient environ 300 nm de diamètre pour les LUV et environ 25 nm pour les micelles (**Tableau 3.1**). Ces données rejoignent les résultats observés par López et collaborateurs, où la DLS et la microscopie électronique avec cryofracture montrent la coexistence de deux populations de particules pendant la solubilisation des vésicules de POPC par le TX-100 (López et al. 1998). Il est intéressant de noter que dans la zone de coexistence, on a observé une augmentation de la taille des vésicules mixtes jusqu'à le double de la taille initiale. Cette augmentation peut être causée par la fusion et/ou l'agrégation des vésicules mixtes; ces phénomènes ont déjà été rapportés en présence de TX-100 (Goñi et al. 1986, Halling et Slotte 2004).

À une concentration de TX-100 supérieure à 2.50 mM, seules des micelles mixtes sont présentes dans le mélange (**Tableau 3.1**). Une augmentation supplémentaire de la concentration de TX-100 a entraîné une diminution progressive de la taille des micelles mixtes jusqu'à une taille d'environ 10 nm; donc plus la concentration du TX-100 augmente, plus la taille des micelles mixtes se rapproche de la taille des micelles de TX-100. Ceci est attendu puisque la présence de POPC dans les micelles mixtes augmente leur taille et cet effet s'amointrit au fur et à mesure que la proportion POPC/TX-100 diminue. La taille obtenue à la fin du processus de solubilisation s'approche de celle reportée par López et collaborateurs qui mesurent aussi des micelles d'environ 10 nm à la fin du titrage des LUV de POPC par TX-100 (López et al. 1998). Le rapport  $R_{\text{sat}}^{\text{micelle}}$  obtenu était de 2 pour le système TX-100/POPC (**Tableau 3.7**). Ce rapport est dans le même ordre de grandeur que celui trouvé Heerklotz et collaborateurs, une valeur de 2 obtenue par ITC, à 37 °C (Heerklotz 2002), et que celui trouvé par López et collaborateurs (López et al. 1998) à l'aide de la DLS, soit 2.

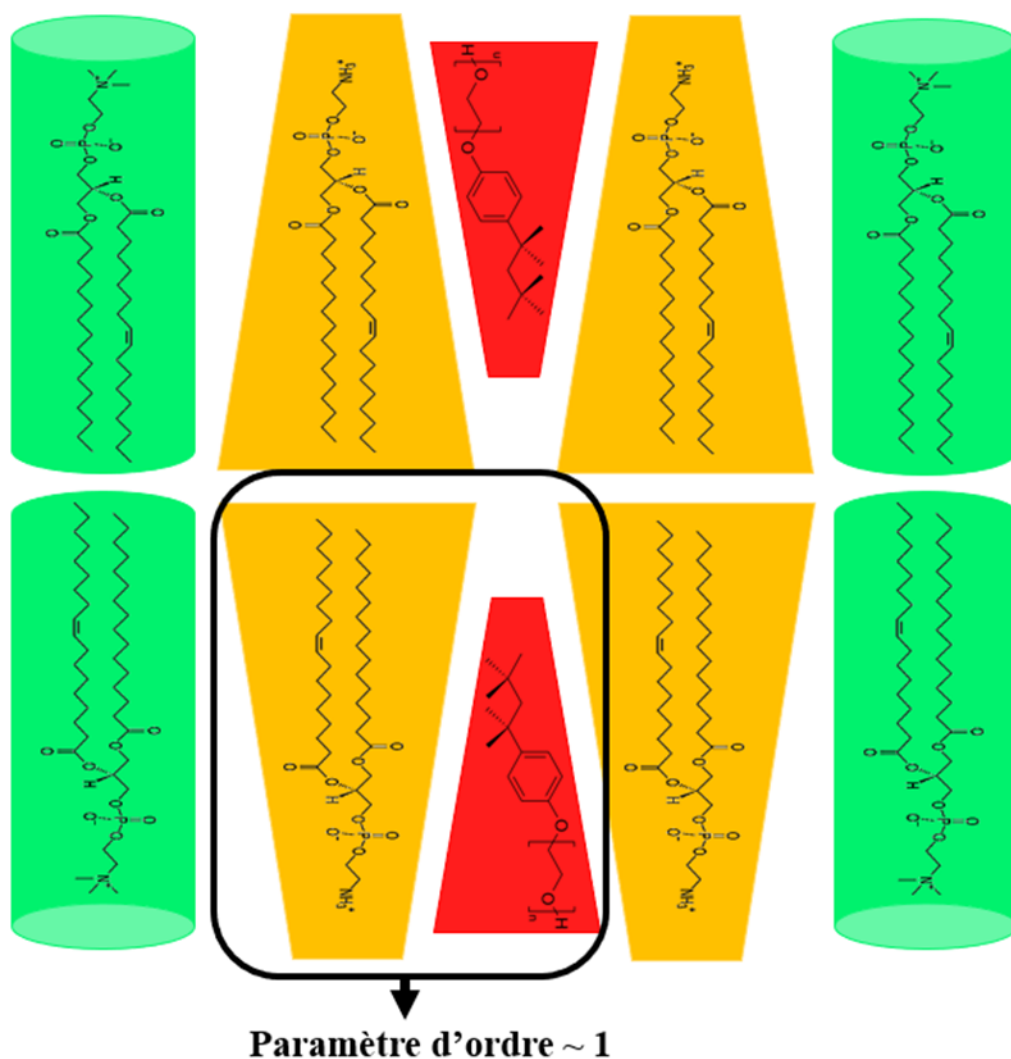
La zone de coexistence pour les trois systèmes lipidiques déterminée par DLS (**Figure 3.1, 3.2 et 3.3**) correspond à la même zone des diagrammes de phases obtenus par ITC par M. Azouz (Azouz 2020). Il est intéressant de noter cependant que les zones de coexistence obtenues par DLS sont plus étroites que celles obtenues par ITC. DLS et ITC caractérisent la zone de coexistence à partir de deux approches différentes. La DLS est sensible aux changements de morphologie et de taille des particules présentes tandis que l'ITC détecte les changements d'enthalpie résultant des interactions entre les LUV et le détergent. Dans ce cas, les frontières de la région de coexistence sont associées à des variations de régimes de ces changements d'enthalpie lors du titrage. Il est possible que ces variations soient observées dès l'apparition des premières micelles dans le cas de la solubilisation ou des premières vésicules dans le cas de la

reconstitution, avant même que ces espèces puissent être détectées par DLS. Il est même possible que les variations apparaissent avant la formation proprement dite des espèces. Des différences de gammes de température de transition lorsque déterminées par des techniques différentes, sensibles à des phénomènes différents, sont courantes: à titre d'exemple, la transition associée à la température de dissolution critique inférieure du copolymère N-isopropylacrylamide-co-N-acryloxysuccinimide mesurée par turbidimétrie et par spectroscopie infrarouge ont des largeurs significativement différentes (Percot et al. 2000).

Nous avons investigué l'effet de la POPE sur la solubilisation de LUV de POPC. Le mécanisme de solubilisation/reconstitution de vésicules de POPC/POPE était semblable à celui trouvé pour les vésicules de POPC. Au début de la solubilisation, l'ajout du TX-100 a entraîné une augmentation la taille de vésicules de POPC/POPE, tout comme dans le cas des vésicules de POPC (**Tableau 3.3**). La saturation des vésicules en TX-100 semble cependant affectée par POPE; le  $R_{\text{sat}}^{\text{bicouche}}$  est 1.8 et 1.1 pour les LUV de POPC/POPE et POPC, respectivement (**Tableau 3.7**). Ces résultats indiquent que les LUV de POPC/POPE peuvent accepter une plus grande quantité de TX-100 avant de produire des micelles que celles de POPC. Les mesures de turbidité rapportées par Urbaneja et ses collaborateurs montrent également que le rapport de saturation des vésicules POPC/POPE par TX-100 est considérablement plus élevé que pour les vésicules POPC (Urbaneja et al. 1987). La POPE, à cause de petit volume de sa tête polaire et de sa capacité à former des liaisons hydrogène intermoléculaires, est associée à une forme conique avec un paramètre d'empilement,  $P$ , plus grand que 1 (voir **Section 1.4**) (Therrien et Lafleur 2016). La POPC a une forme cylindrique, et un paramètre d'empilement autour de 1, une valeur favorisant la formation de bicouches. Le TX-100 a une grosse tête polaire et une seule chaîne acyle, ce qui lui confère un paramètre d'empilement inférieur à 1. Dans le cas

d'auto-assemblages contenant plusieurs espèces lipidiques, on peut supposer que le paramètre d'empilement global du système correspond à la combinaison linéaire de ceux des espèces individuelles (Lafleur et al. 1996). Ainsi le mélange POPC/POPE possède un  $P$  plus grand que la bicouche de POPC pure, tout en restant dans une gamme de valeur conduisant à la formation de bicouche. L'ajout de TX-100 ( $P < 1$ ) dans les membranes de POPC/POPE diminue cette valeur et il faut ajouter plus de TX-100 pour atteindre la valeur de  $P$  pour laquelle on assiste à la formation de micelles. Ainsi l'appariement des molécules de forme conique de la POPE et de forme conique inversée du TX-100 fait en sorte que le paramètre  $P$  demeure dans la gamme de valeurs conduisant à des bicouches (autour de 1) pour une grande quantité de TX-100. Cette hypothèse est illustrée schématiquement à la **Figure 3.5**. Le **Tableau 3.7** montre également que la valeur de  $R_{\text{sat}}^{\text{micelle}}$  du mélange de POPC/POPE est supérieure à celle du mélange de POPC. Comme mentionné plus haut, en supposant que les paramètres d'empilement dans le mélange sont additifs, les micelles TX-100 ( $P < 1$ ) peuvent accepter moins de vésicules POPC / POPE avant de produire des bicouches.





**Figure 3.5 :** Hypothèse de l'additivité du paramètre d'ordre pour le mélange de POPC/POPE - TX-100. La POPC est indiquée en vert, la POPE en or et le TX-100 en rouge.

Dans le cas du système POPC/POPG-TX-100, le mécanisme de solubilisation/reconstitution est similaire à celui observé pour les vésicules POPC. Au début du titrage de solubilisation, le TX-100 a entraîné une augmentation progressive de la taille de vésicules de POPC/POPG, tout comme les cas des vésicules de POPC et POPC/POPE (**Tableau 3.5**). Les valeurs de  $R_{sat}^{bicouche}$  et  $R_{sat}^{micelle}$  obtenues pour POPC/POPG sont aussi très semblables

à celles déterminées pour POPC (**Tableau 3.7**). Ces résultats indiquent que la présence de POPG n'affecte pas significativement les interactions avec TX-100 qui, le rappelle-t-on, est un détergent neutre. Une étude en turbidimétrie rapporte également que la présence d'un lipide négatif, la cardiolipine, dans les membranes de POPC n'affecte pas significativement la solubilisation des vésicules de POPC par le TX-100 (Urbaneja et al. 1987). On conclut donc à un rôle mineur des interactions électrostatiques dans ce processus.

En conclusion, les mesures présentées dans ce chapitre montrent que le processus de solubilisation/reconstitution associé au Triton X-100 est semblable pour les trois systèmes lipidiques. La POPE, à cause de sa forme, rend la bicouche plus résistante à la solubilisation par le détergent. Les interactions électrostatiques apportées par la présence de POPG ne semblent pas jouer un rôle significatif dans ces processus.

# **Chapitre 4 : Étude des changements morphologiques des vésicules de POPC induits par la BSP1 par la diffusion dynamique de la lumière**

## **4.1 Introduction**

Le présent travail a été réalisé pour étudier l'interaction de la protéine BSP1 avec les membranes modèles de POPC, en vérifiant les modifications morphologiques des membranes de POPC induites par la protéine BSP1. La proposition principale consiste à étudier à l'aide de la diffusion dynamique de la lumière la variation du diamètre des particules formées par des mélanges de POPC/BSP1. De plus, on a étudié l'effet de la température sur ces particules.

## **4.2 Matériel et méthodes**

### **4.2.1 Matériel**

La protéine BSP1, la POPC, le MOPS, l'EDTA, le molybdate d'ammonium, le méthanol de lavage, l'acide acétique glacial, l'acide sulfurique (95-98%) et le chlorure de sodium ont été obtenus tel que décrit dans la **Section 2.2**.

### **4.2.2 Préparation des solutions**

Pour les expériences de DLS, la protéine BSP1 a été solubilisée dans le tampon MOPS pH 7.4 (50 mM de MOPS, 50 mM de NaCl, 0.1 mM, préparé dans l'eau ultra-pure (18.2 MΩ cm)), à une concentration d'environ 233 μM. Les LUV de POPC ont été préparées dans le même tampon MOPS, à une concentration de 100 μM, par la méthode d'extrusion (Batzri et Korn 1973, McKnight et al. 1991), selon la même procédure que dans la **Section 2.2**.

### 4.2.3 Mesure de la DLS

Les titrages par DLS ont été effectués en ajoutant des aliquotes de suspension de LUV de POPC à une solution de la protéine BSP1, sous agitation, pendant 10 min. Le diamètre des particules dans les échantillons a ensuite été analysé avec un appareil *Zetasizer Nano* (Malvern Instruments, Worcestershire, UK), couplé à un autocorrélateur (Malvern Instruments, Worcestershire, UK). Les échantillons, d'un volume final de 1000  $\mu\text{l}$ , ont été placés dans des cuvettes de PMMA. Les études de distribution de la taille des particules ont été effectuées à une température de  $25.0 \pm 0.1$  °C. Toutes les analyses de la DLS ont été effectuées avec les mêmes conditions que les processus de solubilisation et reconstitution (voir **Section 3.2**). Les valeurs présentées sont une moyenne de trois collectes de données.

## 4.3 Résultats

### 4.3.1 Effet de la BSP1 sur la taille des vésicules de POPC étudié par la DLS

Des expériences de diffusion dynamique de la lumière ont été effectuées pour caractériser les variations de la taille des vésicules POPC en fonction des concentrations croissantes des protéines BSP1. Les tailles obtenues sont présentées au **Tableau 4.1**.

**Tableau 4.1 :** Variation de distribution de taille des vésicules POPC en présence de concentrations croissantes de la protéine BSP1, à  $25.0 \pm 0.1$  °C.

Échantillon	[BSP1] (μM)	[POPC] (μM)	Description des particules détectées				PDI
			1 <sup>er</sup> pic		2 <sup>ème</sup> pic		
			Diamètre (nm)	Proportion (%) <sup>b</sup>	Diamètre (nm)	Proportion (%) <sup>b</sup>	
BSP1	233	–	98 ± 3	56.8 ± 0.2	17.4 ± 0.2	43.2 ± 0.2	0.48
POPC	–	100	130 ± 1	100	–	–	0.09
1	1.2	99.5	140 ± 1	100	–	–	0.07
2	3	99	144 ± 1	100	–	–	0.11
3	5	98	140 ± 1	100	–	–	0.12
4	10	96	137 ± 2	100	–	–	0.12
5	18.4	92	136 ± 1	100	–	–	0.14
6	27	89	135.4 ± 0.4	100	–	–	0.15
7	34.2	85	134 ± 2	100	–	–	0.16
8	41.2	82	130 ± 1	100	–	–	0.15
9	48	80	127 ± 1	100	–	–	0.16
10	60	75	127 ± 2	100	–	–	0.20
11	79	66	130 ± 1	100	–	–	0.24
12	95	59	130.8 ± 0.2	100	–	–	0.28
13	113	52	131 ± 1	93.4 ± 0.4	14 ± 2	6.6 ± 0.4	0.32
14	123	47	127 ± 2	92 ± 1	14 ± 1	9 ± 1	0.32

(b) Proportion de l'intensité.

Les vésicules POPC pure ont montré un diamètre d'environ  $130 \pm 1$  nm et un indice de polydispersité inférieur à 0.3, ce qui indiquait une taille des vésicules relativement homogène. La protéine BSP1 seule en solution a montré un grand indice de polydispersité, ce qui indiquait la présence de particules de différentes tailles. D'ailleurs, on a identifié deux populations différentes, l'une ayant un diamètre de  $98 \pm 3$  nm et l'autre ayant un diamètre de  $17.4 \pm 0.2$  nm. Pour les vésicules de POPC (concentration initiale de 100  $\mu$ M) avec une concentration entre 1.2 et 95  $\mu$ M de la BSP1, le diamètre moyen des particules a varié entre  $140 \pm 1$  et  $130.8 \pm 0.2$  nm,

tandis que l'indice de polydispersité demeurerait inférieur à 0.3 pour toutes ces mesures. Pour des concentrations en protéine de 113  $\mu\text{M}$  ou plus, une deuxième population de particules, ayant un diamètre d'environ 14 nm, est détectée.

**Tableau 4.2 :** Variation de distribution de taille d'un échantillon formé de 47  $\mu\text{M}$  de POPC et 123  $\mu\text{M}$  de BSP1 (correspondant à l'**Échantillon 14** du titrage présenté au **Tableau 4.1**) en fonction du temps à  $25.0 \pm 0.1$  °C.

Temps	Description des particules détectées			
	1 <sup>er</sup> pic		2 <sup>ème</sup> pic	
	Diamètre (nm)	Proportion (%) <sup>b</sup>	Diamètre (nm)	Proportion (%) <sup>b</sup>
1 <sup>er</sup> jour <sup>a</sup>	128 $\pm$ 2	92 $\pm$ 1	14 $\pm$ 1	9 $\pm$ 1
3 <sup>ème</sup> jour <sup>a</sup>	131 $\pm$ 1	92 $\pm$ 1	13 $\pm$ 1	8 $\pm$ 1
5 <sup>ème</sup> jour <sup>a</sup>	132 $\pm$ 1	93 $\pm$ 1	12 $\pm$ 2	7 $\pm$ 1
7 <sup>ème</sup> jour <sup>a</sup>	129 $\pm$ 1	92.7 $\pm$ 0.4	13 $\pm$ 1	7.3 $\pm$ 0.4

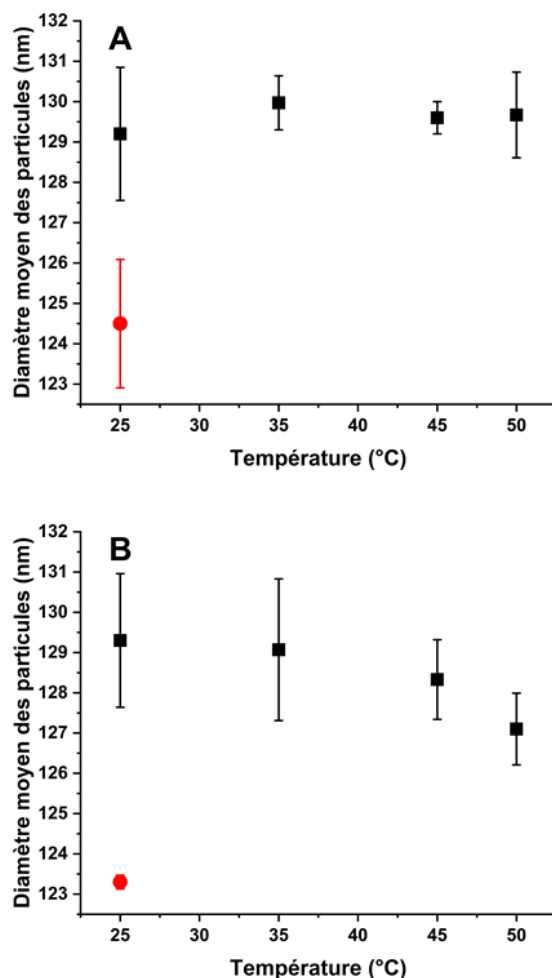
(a) Signifie que l'indice de polydispersité est inférieur à 0.3.

(b) Proportion de l'intensité.

Nous avons examiné la stabilité des particules en fonction du temps. Le **Tableau 4.2** montre la variation du diamètre en fonction du temps pour des vésicules POPC (47  $\mu\text{M}$ ) incubées avec la BSP1 (123  $\mu\text{M}$ ) (correspondant à l'**Échantillon 14** du **Tableau 4.1**). On observe qu'il y a aucune variation de diamètre dans l'intervalle de temps de 7 jours pour cet échantillon: il y a toujours deux populations, une représentant environ 92% des particules avec un diamètre d'environ 130 nm et des particules d'environ 13 nm de diamètre constituant une proportion d'environ 8%.

La stabilité des échantillons en fonction de la température a aussi été examinée. Le diamètre des particules a été mesuré pour des échantillons de BSP1 (57.5  $\mu\text{M}$ ) avec de la POPC (858  $\mu\text{M}$ , soit un ratio POPC/BSP1 de 15, et 289  $\mu\text{M}$ , un ratio POPC/BSP1 de 5) (**Figure 4.1**).

Les expériences de DLS ont été réalisées à 25, 35, 45 et 50 °C. Nous avons observé que, dans ces conditions, le diamètres des particules ne varie pas en fonction de la température. Même après le chauffage des échantillons à 50 °C, le diamètre des LUV reste à peu près constant quand l'échantillon est refroidi à 25 °C (moins de 5% de variation).



**Figure 4.1 :** Variation thermique de la taille des particules formées dans un échantillon avec un **A)** ratio POPC/BSP1 = 15, et **B)** ratio POPC/BSP1 = 5. Les symboles carrés représentent la variation lors de la chauffe de 25 à 50°C, tandis que les cercles la mesure de taille lors du retour à la température de 25°C.

## 4.4 Discussion

L'effet de la protéine BSP1 sur la morphologie des vésicules lipidiques a été étudié par des mesures de la diffusion dynamique de la lumière. Les mesures en DLS démontrent que la protéine BSP1 existe sous forme de deux populations différentes, l'une ayant un diamètre de 98 nm et l'autre, de 17 nm. Il a été proposé que le diamètre moyen d'un monomère de la protéine est d'environ 3.5 nm (Erickson 2009). Nos résultats montrent alors que les protéines en solution tendent à s'associer pour former des agrégats de tailles spécifiques. Des études précédentes ont montré que la protéine existe sous forme d'agrégats, allant de dimères à octomères en conditions physiologiques. De plus, l'état d'agrégation de la protéine est modulé par plusieurs facteurs, incluant le pH de milieu, la force ionique, et la température (Plante et al. 2016). Nous concluons que la protéine utilisée existait principalement sous forme agrégée.

Nous avons procédé au titrage de vésicules de POPC par la protéine BSP1 (**Tableau 4.1**) afin d'examiner l'impact de la protéine sur la morphologie des vésicules lipidiques. L'ajout de BSP1 jusqu'à une concentration de 3  $\mu$ M aux LUV de POPC a entraîné une légère augmentation de la taille des LUV, de 130 à 144 nm. Cette petite augmentation est attribuée à l'association de la forme multimère de la protéine à la surface de la membrane. L'association de la protéine aux liposomes est supportée par la disparition des plus petits agrégats (diamètre de 17 nm) de BSP1. Pour des concentrations entre 5 et 95  $\mu$ M de la BSP1, on observe une seule population de particules avec un diamètre variant entre 130 et 140 nm. Dans cette gamme de concentration, la valeur du rapport molaire POPC/BSP1 varie de 20 et 0.6. Plusieurs travaux suggèrent que la saturation de bicouches de PC par la BSP1 se fait avec de 10 à 15 PC par BSP1 (Müller et al. 1998, Gasset et al. 2000, Ramakrishnan et al. 2001, Lassiseraye et al. 2008). Ainsi, dans les conditions explorées lors du titrage, le rapport PC/BSP1 atteint des valeurs beaucoup plus



petites. On peut donc supposer que, durant le titrage, il y a d'abord saturation des liposomes puis une transition des vésicules saturées en BSP1 à des complexes de protéines avec des lipides. Cependant, il semble que toutes les particules ont la même taille et qu'il est impossible de les différencier par la technique de la DLS. Lorsque la concentration de BSP1 est supérieure à 95  $\mu\text{M}$ , on retrouve, en plus de la population avec un diamètre autour de 130 nm, une seconde population avec un diamètre de 14 nm; la réapparition des plus petits multimères de BSP1 (contenant peut-être des lipides), avec un diamètre de 14 nm semble traduire un grand excès de protéine.

Comme mentionné à la **Section 1.6**, la littérature rapporte divers structures et tailles d'auto-assemblages résultant de l'interaction de la BSP1 avec les membranes lipidiques de PC. On fait état de complexes ayant un diamètre d'environ 10 à 40 nm (Gasset et al. 2000), de structures en collier de perles, de petites vésicules ayant un diamètre allant jusqu'à 15 nm et de longs fils spiralés (Lafleur et al. 2010). L'impact de la BSP1 sur la taille et la morphologie des liposomes de PC semble donc différent entre ce que nous observons par DLS et ces études de la littérature. L'origine de ces différences n'est pas identifiée. Il est possible qu'il existe certaines différences déterminantes entre les systèmes tels que l'état d'agrégation de la protéine (qui est difficile à contrôler et à évaluer), la température et le pH de travail, le tampon utilisé et la concentration totale de la protéine et de lipides dans le milieu. Des études supplémentaires sont nécessaires pour détailler l'impact de ces facteurs et identifier quel(s) paramètre(s) influence(nt) la structure des particules résultant de l'interaction de la protéine avec les vésicules lipidiques.

## Chapitre 5 : Conclusion générale

Les interactions entre la protéine BSP1 et les membranes modèles ont été caractérisées à l'aide de la fluorescence intrinsèque de la protéine. L'affinité entre la protéine et les membranes a été quantifiée grâce à un modèle proposé par Ladokhin et collaborateurs (Ladokhin et al. 2000). Ce modèle a permis de déduire que la protéine BSP1 interagit avec les membranes. L'ordre d'affinité de la protéine pour les quatre systèmes lipidiques est le suivant : POPC > POPC/POPE  $\approx$  POPC/POPS > POPC/chol. Cet ordre suggère que l'affinité de la protéine est modulée par la composition lipidique des membranes modèles. Cette étude a confirmé que la protéine possède une affinité spécifique pour les membranes de POPC. Cependant, lors de la substitution de POPC par un autre type de lipide (POPE, POPS, ou cholestérol), son affinité pour les membranes est diminuée.

Il est intéressant de noter que les expériences de ce travail ont été effectuées sur des membranes modèles qui contiennent les lipides représentatifs des membranes lipidiques des spermatozoïdes. Cependant, ces membranes modèles ne reflètent pas la complexité des membranes des spermatozoïdes. Il serait donc intéressant, dans des travaux futurs, d'utiliser des membranes modèles ayant des compositions similaires à celle des membranes des spermatozoïdes pour mieux comprendre l'effet de la protéine BSP1 sur la capacitation des spermatozoïdes. De plus, toutes les études d'affinité, jusqu'à maintenant, ont été effectuées seulement avec les protéines BSP1. Il est donc intéressant de réaliser plusieurs études pour vérifier si toutes les protéines de la famille de BSP réagissent de la même façon que les protéines BSP1.

Plusieurs études démontrent que la protéine BSP1 extrait sélectivement les phospholipides de type choline (Thérien et al. 1999). Cette extraction des lipides induit une solubilisation des membranes lipidiques. Pour investiguer cet effet de façon plus approfondie, la solubilisation et la reconstitution des membranes modèles par TX-100 ont été effectuées. Les résultats obtenus par la DLS et présentés dans le **Chapitre 3**, montrent que le mécanisme de solubilisation et de reconstitution est semblable pour les différents systèmes lipidiques (POPC, POPC/POPE, POPC/POPG). Ce mécanisme montre trois régions : i) le détergent s'interagit avec les membranes, ii) une coexistence de bicouches lipidiques saturées de détergents et de micelles mixtes de lipides/détergents et iii) exclusivement des micelles mixtes de lipides/détergents. Cette étude démontre que la présence de POPE dans les membranes de POPC impacte l'organisation des membranes à cause de sa géométrie et entraîne l'augmentation de la résistance des membranes à la solubilisation. Quant à elles, les interactions électrostatiques apportées par la présence de POPG, un lipide chargé négativement, ne semblent pas affecter les processus de solubilisation/reconstitution.

Les modifications morphologiques des membranes suite à l'association de la protéine BSP1 avec les membranes de POPC ont également été investiguées par la DLS. D'abord, la littérature rapporte différentes structures suite à l'association de la protéine avec les membranes. Nos résultats n'ont montré aucune variation significative de la taille des particules lors de l'association de la protéine. Cependant, on peut supposer que pendant le titrage, il y a une saturation des liposomes par la protéine, puis une transition des vésicules saturées en BSP1 à des complexes de protéines avec des lipides. D'autres études sont nécessaires pour comprendre la différence entre nos études et celles obtenues dans la littérature.

## Références

- Ahyayauch, H., M. I. Collado, F. M. Goñi et D. Lichtenberg (2009). "Cholesterol reverts Triton X-100 preferential solubilization of sphingomyelin over phosphatidylcholine: a  $^{31}\text{P}$ -NMR study." *FEBS Letters* 583(17): 2859-2864.
- Ahyayauch, H., B. Larijani, A. Alonso et F. M. Goñi (2006). "Detergent solubilization of phosphatidylcholine bilayers in the fluid state: influence of the acyl chain structure." *Biochimica et Biophysica Acta* 1758(2): 190-196.
- Amann, R. et B. Pickett (1987). "Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa." *Journal of Equine Veterinary Science* 7(3): 145-173.
- Anbazzhagan, V. et M. J. Swamy (2005). "Thermodynamics of phosphorylcholine and lysophosphatidylcholine binding to the major protein of bovine seminal plasma, PDC-109." *FEBS Letters* 579(13): 2933-2938.
- Azouz, M. (2020). "Vers une compréhension des modes d'action des peptides impliqués dans la maladie d'Alzheimer sur des membranes modèles." Ph.D.: Université de Bordeaux et Université de Montréal.
- Banyai, L., M. Trexler, S. Koncz, M. Gyenes, G. Sipos et L. Patthy (1990). "The collagen-binding site of type-II units of bovine seminal fluid protein PDC-109 and fibronectin." *European Journal of Biochemistry* 193(3): 801-806.
- Bartlett, G. R. (1959). "Phosphorus assay in column chromatography." *Journal of Biological Chemistry* 234(3): 466-468.

Batzri, S. et E. D. Korn (1973). "Single bilayer liposomes prepared without sonication." *Biochimica et Biophysica Acta* 298(4): 1015-1019.

Benachir, T., M. Monette, J. Grenier et M. Lafleur (1997). "Melittin-induced leakage from phosphatidylcholine vesicles is modulated by cholesterol: a property used for membrane targeting." *European Biophysics Journal* 25(3): 201-210.

Borg, C. L., K. M. Wolski, G. M. Gibbs et M. K. O'Bryan (2009). "Phenotyping male infertility in the mouse: how to get the most out of a 'non-performer'." *Human Reproduction Update* 16(2): 205-224.

Calvete, J. J., M. A. Campanero-Rhodes, M. Raida et L. Sanz (1999). "Characterisation of the conformational and quaternary structure-dependent heparin-binding region of bovine seminal plasma protein PDC-109." *FEBS Letters* 444(2-3): 260-264.

Calvete, J. J., K. Mann, L. Sanz, M. Raida et E. Töpfer-Petersen (1996). "The primary structure of BSP-30K, a major lipid-, gelatin-, and heparin-binding glycoprotein of bovine seminal plasma." *FEBS Letters* 399(1-2): 147-152.

Calvete, J. J., M. Raida, L. Sanz, F. Wempe, K.-H. Scheit, A. Romero et E. Töpfer-Petersen (1994). "Localization and structural characterization of an oligosaccharide O-linked to bovine PDC-109 Quantitation of the glycoprotein in seminal plasma and on the surface of ejaculated and capacitated spermatozoa." *FEBS Letters* 350(2-3): 203-206.

Cardozo, J., M. Fernández-Juan, F. Forcada, A. Abecia, T. Muiño-Blanco et J. Cebrián-Pérez (2006). "Monthly variations in ovine seminal plasma proteins analyzed by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis." *Theriogenology* 66(4): 841-850.

Chandonnet, L., K. Roberts, A. Chapdelaine et P. Manjunath (1990). "Identification of heparin-binding proteins in bovine seminal plasma." *Molecular Reproduction Development* 26(4): 313-318.

Clegg, E. et R. Foote (1973). "Phospholipid composition of bovine sperm fractions, seminal plasma and cytoplasmic droplets." *Journal of reproduction and fertility* 34(2): 379-383.

Constantine, K. L., M. Madrid, L. Bányai, M. Trexler, L. Patthy et M. Llinás (1992). "Refined solution structure and ligand-binding properties of PDC-109 domain b: a collagen-binding type II domain." *Journal of Molecular Biology* 223(1): 281-298.

Davis, B. K. (1981). "Timing of fertilization in mammals: sperm cholesterol/phospholipid ratio as a determinant of the capacitation interval." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78(12): 7560.

De la Maza, A. et J. L. Parra (1994). "Vesicle-micelle structural transition of phosphatidylcholine bilayers and Triton X-100." *Biochemical Journal* 303(3): 907-914.

Desnoyers, L. et P. Manjunath (1992). "Major proteins of bovine seminal plasma exhibit novel interactions with phospholipid." *Journal of Biological Chemistry* 267(14): 10149-10155.

Douliez, J.-P., A. Léonard et E. J. Dufourc (1996). "Conformational order of DMPC sn-1 versus sn-2 chains and membrane thickness: an approach to molecular protrusion by solid state <sup>2</sup>H-NMR and neutron diffraction." *The Journal of Physical Chemistry* 100(47): 18450-18457.

Egan, R. W. (1976). "Hydrophile-lipophile balance and critical micelle concentration as key factors influencing surfactant disruption of mitochondrial membranes." *Journal of Biological Chemistry* 251(14): 4442-4447.

El Jastimi, R., K. Edwards et M. Lafleur (1999). "Characterization of permeability and morphological perturbations induced by nisin on phosphatidylcholine membranes." *Biophysical Journal* 77(2): 842-852.

Erickson, H. P. (2009). "Size and shape of protein molecules at the nanometer level determined by sedimentation, gel filtration, and electron microscopy." *Biological Procedures Online* 11(1): 32-51.

Esch, F., N. Ling, P. Böhlen, S. Ying et R. Guillemin (1983). "Primary structure of PDC-109, a major protein constituent of bovine seminal plasma." *Biochemical Biophysical Research Communications* 113(3): 861-867.

Gasset, M., L. Magdaleno et J. J. Calvete (2000). "Biophysical study of the perturbation of model membrane structure caused by seminal plasma protein PDC-109." *Archives of Biochemistry Biophysics* 374(2): 241-247.

Gasset, M., J. L. Saiz, J. Laynez, L. Sanz, M. Gentzel, E. Töpfer-Petersen et J. J. Calvete (1997). "Conformational features and thermal stability of bovine seminal plasma protein PDC-109 oligomers and phosphorylcholine-bound complexes." *European Journal of Biochemistry* 250(3): 735-744.

Gatti, J.-L., X. Druart, P. Syntin, Y. Guérin, J.-L. Dacheux et F. Dacheux (2000). "Biochemical characterization of two ram cauda epididymal maturation-dependent sperm glycoproteins." *Biology of Reproduction* 62(4): 950-958.

Ghisaidoobe, A. B. et S. J. Chung (2014). "Intrinsic tryptophan fluorescence in the detection and analysis of proteins: a focus on Förster resonance energy transfer techniques." *International Journal of Molecular Sciences* 15(12): 22518-22538.

Goñi, F. M., M. A. Urbaneja, J. L. R. Arrondo, A. Alonso, A. A. Durrani et D. Chapman (1986). "The interaction of phosphatidylcholine bilayers with Triton X-100." *European Journal of Biochemistry* 160(3): 659-665.

Gregoriadis, G. (1991). "Overview of liposomes." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 28(suppl\_B): 39-48.

Gwathmey, T. M., G. G. Ignotz et S. S. Suarez (2003). "PDC-109 (BSP-A1/A2) promotes bull sperm binding to oviductal epithelium in vitro and may be involved in forming the oviductal sperm reservoir." *Biology of Reproduction* 69(3): 809-815.

Halling, K. K. et J. P. Slotte (2004). "Membrane properties of plant sterols in phospholipid bilayers as determined by differential scanning calorimetry, resonance energy transfer and detergent-induced solubilization." *Biochimica et Biophysica Acta* 1664(2): 161-171.

Heerklotz, H. (2002). "Triton promotes domain formation in lipid raft mixtures." *Biophysical Journal* 83(5): 2693-2701.

Heerklotz, H. (2008). "Interactions of surfactants with lipid membranes." *Quarterly Reviews of Biophysics* 41(3-4): 205-264.

Heerklotz, H. et J. Seelig (2000). "Correlation of membrane/water partition coefficients of detergents with the critical micelle concentration." *Biophysical Journal* 78(5): 2435-2440.

Helenius, A. et K. Simons (1975). "Solubilization of membranes by detergents." *Biochimica et Biophysica Acta* 415(1): 29-79.

Helfrich, W. (1973). "Elastic properties of lipid bilayers: theory and possible experiments." *Zeitschrift Für Naturforschung C* 28(11-12): 693-703.



Henricks, D. M., A. J. Kouba, B. R. Lackey, W. R. Boone et S. L. Gray (1998). "Identification of insulin-like growth factor I in bovine seminal plasma and its receptor on spermatozoa: influence on sperm motility." *Biology of Reproduction* 59(2): 330-337.

Israelachvili, J., S. Marčelja et R. G. Horn (1980). "Physical principles of membrane organization." *Quarterly Reviews of Biophysics* 13(2): 121-200.

Israelachvili, J. N. (1992). Intermolecular and surface forces, Academic Press.

Israelachvili, J. N., D. J. Mitchell et B. W. Ninham (1976). "Theory of self-assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers." *Journal of the Chemical Society* 72: 1525-1568.

Jobim, M., E. Oberst, C. Salbego, D. Souza, V. Wald, F. Tramontina et R. Mattos (2004). "Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability." *Theriogenology* 61(2-3): 255-266.

Kanášová, M. et K. Nesměrák (2017). "Systematic review of liposomes' characterization methods." *Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly* 148(9): 1581-1593.

Kareskoski, M. et T. Katila (2008). "Components of stallion seminal plasma and the effects of seminal plasma on sperm longevity." *Animal Reproduction Science* 107(3-4): 249-256.

Kim, H. J., M. Y. Choi, H. J. Kim et M. Llinás (2010). "Conformational dynamics and ligand binding in the multi-domain protein PDC109." *PloS One* 5(2): e9180.

Knol, J., K. Sjollema et B. Poolman (1998). "Detergent-mediated reconstitution of membrane proteins." *Biochemistry* 37(46): 16410-16415.

Krylova, O. O., N. Jahnke et S. Keller (2010). "Membrane solubilisation and reconstitution by octylglucoside: comparison of synthetic lipid and natural lipid extract by isothermal titration calorimetry." *Biophysical Chemistry* 150(1-3): 105-111.

Ladokhin, A. S., S. Jayasinghe et S. H. White (2000). "How to measure and analyze tryptophan fluorescence in membranes properly, and why bother?" *Analytical Biochemistry* 285(2): 235-245.

Lafleur, M., M. Bloom, E. F. Eikenberry, S. M. Gruner, Y. Han et P. R. Cullis (1996). "Correlation between lipid plane curvature and lipid chain order." *Biophysical Journal* 70(6): 2747-2757.

Lafleur, M., L. Courtemanche, G. Karlsson, K. Edwards, J.-L. Schwartz et P. Manjunath (2010). "Bovine binder-of-sperm protein BSP1 promotes protrusion and nanotube formation from liposomes." *Biochemical Biophysical Research Communications* 399(3): 406-411.

Lafleur, M., P. Cullis et M. Bloom (1990). "Modulation of the orientational order profile of the lipid acyl chain in the L  $\alpha$  phase." *European Biophysics Journal* 19(2): 55-62.

Lambert, C. C. et D. E. Battaglia (1993). "Loss of the paternal mitochondrion during fertilization." *Zoological Science* 10(1): 31-37.

Lasch, J. (1995). "Interaction of detergents with lipid vesicles." *Biochimica et Biophysica Acta* 1241(2): 269-292.

Lassisera, D., L. Courtemanche, A. Bergeron, P. Manjunath et M. Lafleur (2008). "Binding of bovine seminal plasma protein BSP-A1/-A2 to model membranes: lipid specificity and effect of the temperature." *Biochimica et Biophysica Acta* 1778(2): 502-513.

le Maire, M., P. Champeil et J. V. Møller **(2000)**. "Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents." *Biochimica et Biophysica Acta* 1508(1-2): 86-111.

Levy, D., A. Gulik, M. Seigneuret et J. L. Rigaud **(1990)**. "Phospholipid vesicle solubilization and reconstitution by detergents. Symmetrical analysis of the two processes using octaethylene glycol mono-n-dodecyl ether." *Biochemistry* 29(40): 9480-9488.

Li, X.-M., M. M. Momsen, J. M. Smaby, H. L. Brockman et R. E. Brown **(2001)**. "Cholesterol decreases the interfacial elasticity and detergent solubility of sphingomyelins." *Biochemistry* 40(20): 5954-5963.

Lichtenberg, D., H. Ahyayauch, A. Alonso et F. M. Goñi **(2013)**. "Detergent solubilization of lipid bilayers: a balance of driving forces." *Trends in Biochemical Sciences* 38(2): 85-93.

Lichtenberg, D., R. J. Robson et E. A. Dennis **(1983)**. "Solubilization of phospholipids by detergents structural and kinetic aspects." *Biochimica et Biophysica Acta* 737(2): 285-304.

Lim, J., S. P. Yeap, H. X. Che et S. C. Low **(2013)**. "Characterization of magnetic nanoparticle by dynamic light scattering." *Nanoscale Research Letters* 8(1): 381.

López, O., M. Cócera, L. Coderch, J. L. Parra, L. Barsukov et A. de la Maza **(2001)**. "Octyl glucoside-mediated solubilization and reconstitution of liposomes: structural and kinetic aspects." *The Journal of Physical Chemistry B* 105(40): 9879-9886.

López, O., M. Cócera, R. Pons, N. Azemar, C. López-Iglesias, E. Wehrli, J. L. Parra et A. de La Maza **(1999)**. "Use of a dynamic light scattering technique to study the kinetics of liposome solubilization by Triton X-100." *Langmuir* 15(13): 4678-4681.

López, O., A. de la Maza, L. Coderch, C. López-Iglesias, E. Wehrli et J. L. Parra (1998). "Direct formation of mixed micelles in the solubilization of phospholipid liposomes by Triton X-100." *FEBS Letters* 426(3): 314-318.

Lorin, A., C. Flore, A. Thomas et R. Brasseur (2004). "Les liposomes: description, fabrication et applications." *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*.

Manjunath, P., A. Bergeron, J. Lefebvre et J. Fan (2007). "Seminal plasma proteins: functions and interaction with protective agents during semen preservation." *Society of Reproduction Fertility supplement* 65: 217-228.

Manjunath, P., L. Chandonnet, E. Leblond et L. Desnoyers (1994). "Major proteins of bovine seminal vesicles bind to spermatozoa." *Biology of Reproduction* 50(1): 27-37.

Manjunath, P., J. Lefebvre, P. S. Jois, J. Fan et M. W. Wright (2009). "New nomenclature for mammalian BSP genes." *Biology of Reproduction* 80(3): 394-397.

Manjunath, P. et M. Sairam (1987). "Purification and biochemical characterization of three major acidic proteins (BSP-A1, BSP-A2 and BSP-A3) from bovine seminal plasma." *Biochemical Journal* 241(3): 685-692.

Manjunath, P., M. Sairam et J. Uma (1987). "Purification of four gelatin-binding proteins from bovine seminal plasma by affinity chromatography." *Bioscience Reports* 7(3): 231-238.

Manjunath, P. et I. Thérien (2002). "Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation." *Journal of Reproductive Immunology* 53(1-2): 109-119.

- Mann, T. et C. Lutwak-Mann (1981). Male reproductive function and the composition of semen, Springer, Berlin.
- Martínez, P. et A. Morros (1996). "Membrane lipid dynamics during human sperm capacitation." *Frontiers in Bioscience* 1: d103-117.
- Mattei, B., A. D. França et K. A. Riske (2014). "Solubilization of binary lipid mixtures by the detergent Triton X-100: the role of cholesterol." *Langmuir* 31(1): 378-386.
- McKnight, C. J., M. Rafalski et L. M. Gierasch (1991). "Fluorescence analysis of tryptophan-containing variants of the LamB signal sequence upon insertion into a lipid bilayer." *Biochemistry* 30(25): 6241-6246.
- Moreau, R., P. G. Frank, C. Perreault, Y. L. Marcel et P. Manjunath (1999). "Seminal plasma choline phospholipid-binding proteins stimulate cellular cholesterol and phospholipid efflux." *Biochimica et Biophysica Acta* 1438(1): 38-46.
- Moreau, R. et P. Manjunath (1999). "Characterization of lipid efflux particles generated by seminal phospholipid-binding proteins." *Biochimica et Biophysica Acta* 1438(2): 175-184.
- Moreau, R., I. Thérien, C. Lazure et P. Manjunath (1998). "Type II domains of BSP-A1/-A2 proteins: binding properties, lipid efflux, and sperm capacitation potential." *Biochemical Biophysical Research Communications* 246(1): 148-154.
- Moura, A. A., H. Koc, D. A. Chapman et G. J. Killian (2006). "Identification of proteins in the accessory sex gland fluid associated with fertility indexes of dairy bulls: a proteomic approach." *Journal of Andrology* 27(2): 201-211.

- Moura, A. A., C. E. Souza, B. A. Stanley, D. A. Chapman et G. J. Killian (2010). "Proteomics of cauda epididymal fluid from mature Holstein bulls." *Journal of Proteomics* 73(10): 2006-2020.
- Mui, B., L. Chow et M. J. Hope (2003). "Extrusion technique to generate liposomes of defined size." *Methods in Enzymology* 367: 3-14.
- Muñoz-Blanco, T., R. Pérez-Pé et J. Cebrián-Pérez (2008). "Seminal plasma proteins and sperm resistance to stress." *Reproduction in Domestic Animals* 43: 18-31.
- Müller, P., K.-R. Erlemann, K. Müller, J. J. Calvete, E. Töpfer-Petersen, K. Marienfeld et A. Herrmann (1998). "Biophysical characterization of the interaction of bovine seminal plasma protein PDC-109 with phospholipid vesicles." *European Biophysics Journal* 27(1): 33-41.
- Müller, P., A. Greube, E. Töpfer-Petersen et A. Herrmann (2002). "Influence of the bovine seminal plasma protein PDC-109 on cholesterol in the presence of phospholipids." *European Biophysics Journal* 31(6): 438-447.
- Nauc, V. et P. Manjunath (2000). "Radioimmunoassays for bull seminal plasma proteins (BSP-A1/-A2, BSP-A3, and BSP-30-Kilodaltons), and their quantification in seminal plasma and sperm." *Biology of Reproduction* 63(4): 1058-1066.
- Nolan, J. P. et R. H. Hammerstedt (1997). "Regulation of membrane stability and the acrosome reaction in mammalian sperm." *FASEB Journal* 11(8): 670-682.
- Ohvo-Rekilä, H., B. Ramstedt, P. Leppimäki et J. P. Slotte (2002). "Cholesterol interactions with phospholipids in membranes." *Progress in Lipid Research* 41(1): 66-97.

Ollivon, M., S. Lesieur, C. Grabielle-Madelmont et M. t. Paternostre **(2000)**. "Vesicle reconstitution from lipid-detergent mixed micelles." *Biochimica et Biophysica Acta* 1508(1-2): 34-50.

Paradies, H. H. **(1980)**. "Shape and size of a nonionic surfactant micelle. Triton X-100 in aqueous solution." *The Journal of Physical Chemistry* 84(6): 599-607.

Parks, J. et J. Graham **(1992)**. "Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes." *Theriogenology* 38(2): 209-222.

Parks, J. E., J. W. Arion et R. Foote **(1987)**. "Lipids of plasma membrane and outer acrosomal membrane from bovine spermatozoa." *Biology of Reproduction* 37(5): 1249-1258.

Partearroyo, M. A., A. Alonso, F. M. Goñi, M. Tribout et S. Paredes **(1996)**. "Solubilization of phospholipid bilayers by surfactants belonging to the Triton X series: Effect of polar group size." *Journal of Colloid Interface Science* 178(1): 156-159.

Percot, A., X. Zhu et M. Lafleur **(2000)**. "A simple FTIR spectroscopic method for the determination of the lower critical solution temperature of N-isopropylacrylamide copolymers and related hydrogels." *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics* 38(7): 907-915.

Pizzirusso, A., A. De Nicola, G. A. Sevink, A. Correa, M. Cascella, T. Kawakatsu, M. Rocco, Y. Zhao, M. Celino et G. Milano **(2017)**. "Biomembrane solubilization mechanism by Triton X-100: a computational study of the three stage model." *Physical Chemistry Chemical Physics* 19(44): 29780-29794.

Plante, G., B. Prud'homme, J. Fan, M. Lafleur et P. Manjunath **(2016)**. "Evolution and function of mammalian binder of sperm proteins." *Cell Tissue Research* 363(1): 105-127.

Ramakrishnan, M., V. Anbazhagan, T. Pratap, D. Marsh et M. J. Swamy (2001). "Membrane insertion and lipid-protein interactions of bovine seminal plasma protein PDC-109 investigated by spin-label electron spin resonance spectroscopy." *Biophysical Journal* 81(4): 2215-2225.

Ricker, J., J. Linfor, W. Delfino, P. Kysar, E. Scholtz, F. Tablin, J. Crowe, B. Ball et S. A. Meyers (2006). "Equine sperm membrane phase behavior: the effects of lipid-based cryoprotectants." *Biology of Reproduction* 74(2): 359-365.

Salois, D., M. Ménard, Y. Paquette et P. Manjunath (1999). "Complementary deoxyribonucleic acid cloning and tissue expression of BSP-A3 and BSP-30-kDa: phosphatidylcholine and heparin-binding proteins of bovine seminal plasma." *Biology of Reproduction* 61(1): 288-297.

Schnitzer, E., D. Lichtenberg et M. Kozlov (2003). "Temperature-dependence of the solubilization of dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) by the non-ionic surfactant Triton X-100, kinetic and structural aspects." *Chemistry and Physics of Lipids* 126(1): 55-76.

Schurtenberger, P., N. Mazer et W. Känzig (1985). "Micelle to vesicle transition in aqueous solutions of bile salt and lecithin." *The Journal of Physical Chemistry* 89(6): 1042-1049.

Seidah, N., P. Manjunath, J. Rochemont, M. Sairam et M. Chretien (1987). "Complete amino acid sequence of BSP-A3 from bovine seminal plasma. Homology to PDC-109 and to the collagen-binding domain of fibronectin." *Biochemical Journal* 243(1): 195-203.

Selivonchick, D. P., P. C. Schmid, V. Natarajan et H. H. Schmid (1980). "Structure and metabolism of phospholipids in bovine epididymal spermatozoa." *Biochimica et Biophysica Acta* 618(2): 242-254.



Shaikh, S. R., M. R. Brzustowicz, N. Gustafson, W. Stillwell et S. R. Wassall (2002). "Monounsaturated PE does not phase-separate from the lipid raft molecules sphingomyelin and cholesterol: role for polyunsaturation?" *Biochemistry* 41(34): 10593-10602.

Simons, K. et W. L. Vaz (2004). "Model systems, lipid rafts, and cell membranes." *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 33: 269-295.

Sot, J., M. I. Collado, J. L. Arrondo, A. Alonso et F. M. Goñi (2002). "Triton X-100-resistant bilayers: effect of lipid composition and relevance to the raft phenomenon." *Langmuir* 18(7): 2828-2835.

Squires, E., B. Pickett, J. Graham, D. Vanderwall, P. McCue et J. Bruemmer (1999). "Cooled and frozen stallion semen: animal reproduction and biotechnology laboratory." Fort Collins: Colorado State University.

Sticht, H., A. R. Pickford, J. R. Potts et I. D. Campbell (1998). "Solution structure of the glycosylated second type 2 module of fibronectin." *Journal of Molecular Biology* 276(1): 177-187.

Stuart, M. C. et E. J. Boekema (2007). "Two distinct mechanisms of vesicle-to-micelle and micelle-to-vesicle transition are mediated by the packing parameter of phospholipid-detergent systems." *Biochimica et Biophysica Acta* 1768(11): 2681-2689.

Swamy, M. J., D. Marsh, V. Anbazhagan et M. Ramakrishnan (2002). "Effect of cholesterol on the interaction of seminal plasma protein, PDC-109 with phosphatidylcholine membranes." *FEBS Letters* 528(1-3): 230-234.

Therien, I., R. Moreau et P. Manjunath (1998). "Major proteins of bovine seminal plasma and high-density lipoprotein induce cholesterol efflux from epididymal sperm." *Biology of Reproduction* 59(4): 768-776.

Thérien, I., R. Moreau et P. Manjunath (1999). "Bovine seminal plasma phospholipid-binding proteins stimulate phospholipid efflux from epididymal sperm." *Biology of Reproduction* 61(3): 590-598.

Therrien, A. (2016). "Étude des mécanismes d'extraction lipidique par le peptide mélittine et la protéine BSP1." Ph.D.: Université de Montréal.

Therrien, A. et M. Lafleur (2016). "Melittin-induced lipid extraction modulated by the methylation level of phosphatidylcholine headgroups." *Biophysical Journal* 110(2): 400-410.

Therrien, A., P. Manjunath et M. Lafleur (2013). "Chemical and physical requirements for lipid extraction by bovine binder of sperm BSP1." *Biochimica et Biophysica Acta* 1828(2): 543-551.

Thomas, C. J., V. Anbazhagan, M. Ramakrishnan, N. Sultan, I. Surolia et M. J. Swamy (2003). "Mechanism of membrane binding by the bovine seminal plasma protein, PDC-109: a surface plasmon resonance study." *Biophysical Journal* 84(5): 3037-3044.

Töpfer-Petersen, E., M. Ekhlas-Hundrieser, C. Kirchhoff, T. Leeb et H. Sieme (2005). "The role of stallion seminal proteins in fertilisation." *Animal Reproduction Science* 89(1-4): 159-170.

Uhumwangho, M. et R. Okor (2005). "Current trends in the production and biomedical applications of liposomes: a review." *Journal of Medicine and Biomedical Research* 4: 9-21.

Urbaneja, M., J. Nieva, F. Goni et A. Alonso (**1987**). "The influence of membrane composition on the solubilizing effects of Triton X-100." *Biochimica et Biophysica Acta* 904(2): 337-345.

Villemure, M., C. Lazure et P. Manjunath (**2003**). "Isolation and characterization of gelatin-binding proteins from goat seminal plasma." *Reproductive Biology Endocrinology* 1(1): 39.

Wah, D. A., C. Fernández-Tornero, L. Sanz, A. Romero et J. J. Calvete (**2002**). "Sperm coating mechanism from the 1.8 Å crystal structure of PDC-109-phosphorylcholine complex." *Structure* 10(4): 505-514.